

---

**Charakterisierung und Bedeutung der Plasmide p1ColV<sub>5155</sub> und p2<sub>5155</sub> für  
den aviären pathogenen *E. coli*-Stamm IMT5155**

DISSERTATION

Zur Erlangung des akademischen Grades

docotor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Biologin Ute Böhnke

14. Februar 1969, Hamburg

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Dr. h.c. C. Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. L.-H. Schön

Gutachter:

1. Prof. Dr. L. H. Wieler
2. Prof. Dr. E. Schneider
3. Prof. Dr. K. Heuner

Tag der mündlichen Prüfung: 11.03.2010

---

Die Dissertation wurde angefertigt im  
Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin  
am  
Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen  
Betreuer: Prof. Dr. L. H. Wieler

APEC, ColV-Plasmid, zoonotisches Potential, eisenakquirierende Systeme, Persistenz in Makrophagen, Genregulation

In der vorliegenden Arbeit wurde das Colicin V-codierende Plasmid p1ColV5155 des aviär pathogenen *E. coli*-Stammes (APEC) IMT5155 (O2:K1:H5) weitestgehend sequenzanalysiert und seine virulenzassoziierten Eigenschaften untersucht. Das ~ 180 kb große p1ColV5155 weist mit EitABC, EtsABCD, Salmochelin, SitABCD und Aerobaktin fünf ABC-Transportsysteme auf, deren Bedeutung für die Aufnahme von Eisenionen für die letztgenannten zwei Systeme mit Hilfe von Cosmidklonen (GB5155cD34, GB5155cD27) in einer Enterobaktin-negativen *E. coli* 1017-Transformante mittels CAS-Assays nachgewiesen werden konnte. Eine signifikante regulatorische Bedeutung von Eisenionen für die Expression plasmidcodierter virulenzassoziiierter Faktoren konnte durch  $\beta$ -Galaktosidase-Expressionsassays in einer IMT5155-Mutante (Iln) für das Serumresistenz steigernde Protein Iss, nicht jedoch für das Temperatursensitive Hämagglutinin (Tsh) nachgewiesen werden. Eine Aktivitätssteigerung beider Promotoren wurde durch eine gute Nährstoffversorgung bei einer Wachstumstemperatur von 37 °C erreicht. Insgesamt lassen die Studienergebnisse darauf rückschließen, dass der Promotor von *tsh* im Gegensatz zu *iss* sehr viel schwächer ist und spezifischer reguliert wird. *In vivo*-Versuche mit einer p1ColV5155-*E. coli* K12-Transformante (IMTp1D01) hatte weder Morbidität noch Mortalität der infizierten 5 Wochen alten SPF-Hühner zur Folge. Verschiedene *in vitro*-Versuche ergaben, dass das Plasmid nicht konjugationsfähig und über Generationen sehr stabil in der *E. coli* K12-Transformante nachzuweisen war. Das Plasmid vermittelte der Transformante eine erhöhte Resistenz beim Wachstum in Hühnerserum sowie eine erhöhte Tenazität in Makrophagen (Maus, J774). Damit weist das ColV-Plasmid eine Reihe genetischer Eigenschaften auf, die den APEC und anderen extraintestinal pathogenen *E. coli*-Stämmen sowohl eine Steigerung der Fitness in der Umwelt als auch ihre Vermehrung im Blut von Mensch und Tier ermöglichen.

APEC, ColV-plasmid, zoonotic risk, acquisition systems for iron, persistence in macrophages, gene regulation

In this study a high molecular weight, colicin V encoding plasmid p1ColV5155 of APEC strain IMT5155 (O2:K1:H5) was nearly complete sequenced and analysed. The most prevalent virulence traits of the ~ 180 kb plasmid are serum resistance (increased serum survival protein, *Iss*), adhesion (temperature-sensitive hemagglutinin, *Tsh*) and five different ABC-transport systems (*EitABC*, *EtsABCD*, salmochelin, *SitABCD* and aerobactin), the latter three being acquisition systems for iron. Studies with cosmids (GB5155cD34, GB5155cD27) which possess only sequences of p1ColV5155 salmochelin and aerobactin in an enterobactin-deficient *E. coli* 1017, confirmed their importance for iron acquisition. The importance of iron in the regulation of the assumed virulence associated genes of the ColV-plasmid was tested especially for the promoter activity of *iss* and *tsh*. Expression studies in  $\beta$ -galactosidase mutated strain of IMT5155 (*Iln*) corroborated the importance of environmental factors including source of sugar and a temperature of 37 °C of both promoter activities. The lack of iron decreases, and growth on serum increased the promoter activity of *iss*. In contrast the activity of the *tsh* promoter was much weaker and there was no indication found for iron-dependent factors which regulate the promoter in a special way. Results of *in vivo* assays with a p1ColV5155-transformant of *E. coli* K12 (IMTp1D01) in five week old SPF-chickens did not result in disease. However, the presence of p1ColV5155 in the *E. coli* K12-strain was solid and increased the ability of the transformant to avoid destruction by bactericidal effects of macrophages (mouse, J774) and to survive in serum *in vitro*. In summary the ColV-plasmid seems to increase the fitness of the APEC and other extraintestinal pathogenic *E. coli*. Multiple iron acquisition and a potent defending system of the host serum help to remain to the environmental and in blood of human and animals alike.



A	Absorption
Abb.	Abbildung
Acc.	„ <i>accession number</i> “, Identifikationsnummer von DNS oder Proteinen
$A_{\text{environ}}$	„ <i>avian environmental E. coli</i> “, <i>E. coli</i> aus der Umwelt des Geflügels
$A_{\text{fecal}}$	„ <i>avian faecal E. coli</i> “, <i>E. coli</i> aus gesundem Geflügelfäces
Amp	Ampicillin
APEC	„ <i>avian pathogenic E. coli</i> “, geflügelpathogener <i>E. coli</i>
ATCC	„ <i>American Type Culture Collection</i> “; weltweite Sammlung von Bakterien-kulturen, Viren, DNS sowie pflanzlicher, tierischer und humaner Zellen
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ARI	Antiinfektiva-Resistenz codierende genetische Insel
AS	Aminosäuren
bp	Basenpaare
bidest.	Zweifach destilliert oder ultrapur
CAS	Chrom-Azurol-S (Agar oder Bouillon)
cDNS	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Cm	Chloramphenicol
ColV	Das Colicin V-Mikrozin codierend
CsCl	Caesiumchlorid
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIP	2, 2'-Dipyridyl
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
EcoR	<i>E. coli</i> Referenzsammlung
ECI	„ <i>ecological island</i> “, ökologische Faktoren codierende genetische Insel
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ExPEC	„ <i>extraintestinal pathogenic E. coli</i> “, extraintestinal pathogene <i>E. coli</i>
FKS	Fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung ( $9,8 \text{ ms}^{-2}$ )
GEI	„ <i>genomic island</i> “, genomische Insel
HPI	„ <i>high-pathogenicity-island</i> “, Hochpathogenitätsinsel
HFEC	„ <i>human faecal E. coli</i> “, humaner apathogener <i>E. coli</i> aus dem Kot
HDTMA	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
i. d. R.	in der Regel
IPEC	„ <i>intestinal pathogenic E. coli</i> “, intestinal pathogener <i>E. coli</i>
kDa	Kilodalton
kbp	Kilobasenpaare
Kan	Kanamycin
LB	„ <i>Lysogeny Broth</i> “ nach Miller
M	Mol
M9	Minimalmedium 9

MGE	Mobile genetische Elemente
Mio.	Millionen
MLST	„ <i>multilocus sequence typing</i> “, DNS-Sequenzierung von gleichen Genfragmenten
MOI	„ <i>multiplicity of infection</i> “, Infektionsdosis
mRNS	„ <i>messenger ribonucleic acid</i> “, Boten-Ribonukleinsäure
n	Anzahl
Nal	Nalidixin
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
NMEC	„ <i>newborne meningitis inducing E. coli</i> “, Neugeborenen-Meningitis hervor-rufender <i>E. coli</i>
NS	Nukleinsäure
$\Omega$	Ohm
OD <sub>xx</sub>	Optische Dichte, gemessen bei einer Wellenlänge von xx nm
ONPG	o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid
<i>orf</i>	„ <i>open reading frame</i> “, offener Leserahmen
<i>ori</i>	„ <i>origin of replication</i> “, Replikationsursprung
PAI	„ <i>pathogenicity island</i> “, Pathogenitätsinsel
PBS	„ <i>phosphate buffered saline</i> “, Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
<i>p. i.</i>	„ <i>post infectionem</i> “, nach erfolgter Infektion
PIPES	Piperazin-N,-N`-bis-(2-ethansulfonsäure)
PCR	„ <i>polymerase chain reaction</i> “, Polymerase-Kettenreaktion
xx <sup>R</sup>	Kennzeichnet eine Antiinfektiva-Resistenz
RFLP	„ <i>restriction fragment length polymorphism</i> “, Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
rpm	„ <i>revolutions per minute</i> “, Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription
RTD	„ <i>routine test dilution</i> “, die bei der Lysotomie entsprechend internationaler Vorschrift eingesetzte Standardkonzentration der Testphagen
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
5'-RACE	„ <i>rapid amplification of cDNA 5'-ends</i> “, Kit
RNS	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
SAI	„ <i>symbiotic island</i> “, symbiotische Faktoren codierende genetische Insel
SDS	Natriumdodecylsulfat
sog.	sogenannte(s)
Spm	Spectinomycin
<i>ssp.</i>	Subspezies
<i>spp.</i>	Mehrzahl von Spezies ( <i>sp.</i> )
Stm	Streptomycin
SVP	„ <i>Salmonella virulence plasmid</i> “, Virulenzplasmide von <i>Salmonella</i> -Stämmen
SYI	„ <i>saprophytic island</i> “, saprophytische Faktoren codierende genetische Insel
Taq	Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
Tab.	Tabelle

TAE	Tris/Acetat/EDTA-Standardpuffer
TBE	Tris/Borsäure/EDTA-Standardpuffer
TdT	Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase
Tet	Tetracyclin
Tris	Tri-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	„unit“, Einheit für Umdrehungen
UPEC	„uropathogenic <i>E. coli</i> “; Harnwegsinfektionen verursachender <i>E. coli</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumen
v/v	„volume per volume“, Volumen pro Volumen
W	Watt
WT	Wildtyp
w/v	„weight per volume“, Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galaktorpyranosid

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Klassifizierung von <i>E. coli</i> -Stämmen.....	1
1.2	Durch ExPEC induzierte Krankheiten bei Mensch und Tier .....	2
1.2.1	Neugeborenen-Meningitis hervorrufende <i>E. coli</i> (NMEC).....	2
1.2.2	Uropathogene <i>E. coli</i> (UPEC).....	3
1.2.3	Aviäre pathogene <i>E. coli</i> (APEC) .....	3
1.3	Virulenzassoziierte Gene von ExPEC.....	4
1.4	Transponierbare Elemente der ExPEC.....	7
1.4.1	Pathogenitätsinseln (PAIs) .....	7
1.4.2	Plasmide .....	9
1.5	ColV-Plasmide .....	15
1.5.1	Nachweis von Siderophoren.....	16
1.5.2	Nachweis von Adhäsinen .....	18
1.5.3	Serum- (Komplement-) resistenz .....	20
1.6	Aufgabenstellung .....	22
<b>2</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>23</b>
2.1	Plasmid-Isolierungen.....	23
2.1.1	Plasmid-Isolierung zur Erstellung eines Plasmidprofils von IMT5155 .....	23
2.1.2	Plasmid-Isolierung für analytische Zwecke .....	24
2.2	Sequenzanalytische Untersuchung von p1ColV <sub>5155</sub> .....	25
2.2.1	Nachweis von p1ColV <sub>5155</sub> -Sequenzen in der Gen-Bibliothek von IMT5155 ..	25
2.2.2	Sequenzvergleich bekannter Colicin-codierender Plasmide mit p1ColV <sub>5155</sub> ...	28
2.2.3	Konservierte Virulenzgencluster.....	31
2.2.4	Lokalisation und Kopienzahl der <i>sit</i> - und <i>iro</i> -Genkluster.....	32
2.2.5	Lokalisation und Kopienzahl der virulenzassoziierten Gene <i>tsh</i> und <i>iss</i> .....	34
2.2.6	Replikations- und Transferregion mit flankierenden Sequenzen.....	35
2.3	Charakterisierung von p2 <sub>5155</sub> .....	36
2.3.1	Bestimmung der Plasmidgröße .....	36
2.3.2	Genetische Organisation von p2 <sub>5155</sub> .....	37
2.4	Phänotypische Charakterisierung von p1ColV <sub>5155</sub> .....	40
2.4.1	Expression und Sekretion von Colicin V .....	40
2.4.2	Sekretion und Funktionalität eisenchelatierender Systeme.....	41
2.4.3	Erzeugung einer p1ColV <sub>5155</sub> -freien IMT5155-Mutante .....	47
2.4.4	Konjugationsversuche mit M00D01 .....	49

2.4.5	Transformation von p1D01 in einen <i>E. coli</i> K12-Stamm .....	50
2.5	Eigenschaften der p1D01-Transformante (IMTp1D01) .....	52
2.5.1	Vergleichende Wachstums-Assays verschiedener <i>E. coli</i> -Stämme in Serum..	52
2.5.2	<i>In vitro</i> -Stabilitätsnachweis von p1D01 in DH5 .....	54
2.5.3	<i>In vivo</i> -Assays mit der Transkonjugante IMTp1D01 .....	54
2.6	Zellkulturversuche mit IMTp1D01 .....	56
2.6.1	Adhäsions- und Invasions-Assays mit aviären Fibroblasten.....	56
2.6.2	Makrophagen-Assay.....	58
2.7	Untersuchungen zur Lokalisation der Promotoren von <i>tsh</i> und <i>iss</i> .....	61
2.7.1	Nachweis der Transkription von <i>tsh</i> und <i>iss</i> .....	61
2.7.2	5'-RACE-PCR zur Lokalisation der Promotoren von <i>tsh</i> und <i>iss</i> .....	62
2.7.3	Sequenzanalyse der RACE-PCR-Produkte.....	64
2.7.4	Ligation der Promotoren in den Expressionsvektor pRS551 .....	65
2.8	Regulationsstudien der Promotoren von <i>tsh</i> und <i>iss</i> .....	67
2.8.1	Regulatorischer Effekt von Komplex- und Minimalmedien.....	68
2.8.2	Regulatorischer Effekt von Hämoglobin.....	69
2.8.3	Regulatorischer Effekt des Eisenchelators 2,2'-Dipyridyl (DIP).....	70
2.8.4	Regulatorischer Effekt verschiedener Anzuchttemperaturen.....	72
2.8.5	Regulatorischer Effekt des genetischen Hintergrundes.....	73
2.8.6	Regulatorischer Effekt von Serum .....	74
2.9	Plasmidprofile pathogener und apathogener <i>E. coli</i> -Stämme .....	75
2.9.1	Plasmidprofile verschiedener NMEC-Isolate.....	75
2.9.2	Plasmidprofile verschiedener apathogener aviärer <i>E. coli</i> -Stämme.....	76
2.9.3	Plasmidabgleich verschiedener <i>E. coli</i> - und ExPEC-Isolate mit p1ColV <sub>5155</sub> ..	77
<b>3</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>79</b>
3.1	Ähnlichkeit der ColV-Plasmide unterschiedlicher APEC-O2-Isolate .....	81
3.2	Ähnlichkeit von aviären und humanen ColV-Plasmiden .....	86
3.2.1	Colicin V .....	87
3.2.2	ColV-Plasmid vermittelte Adhärenz und Invasivität .....	88
3.2.3	ColV-Plasmid vermittelte Serumresistenz .....	90
3.2.4	Bedeutung der verschiedenen eisenakquirierenden Systeme.....	90
3.3	Regulation der Expression von <i>iss</i> und <i>tsh</i> .....	95
3.4	Bedeutung der ColV-Plasmide für die Virulenz von APEC-Stämmen.....	98
<b>4</b>	<b>Material.....</b>	<b>104</b>

4.1	Nährmedien und Anzucht.....	110
4.2	Standardpuffer.....	111
4.3	Zusätze für flüssige und feste Nährmedien.....	112
4.4	Herstellernachweis.....	112
4.5	Molekular-Gewichtsmarker.....	113
4.6	Computerprogramme.....	113
4.7	Geräte.....	114
<b>5</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>115</b>
5.1	Anzucht von Bakterienstämmen.....	115
5.2	Stammhaltung und Konservierung von Bakterienstämmen.....	115
5.3	Messung des Wachstumsverlaufs.....	115
5.4	DNS- und RNS-Grundtechniken.....	115
5.4.1	Behandlung von Geräten und Lösungen bei Arbeiten mit DNS.....	115
5.4.2	Isolierung von Plasmid-DNS.....	115
5.4.3	Konzentrationsbestimmung von DNS.....	117
5.4.4	Behandlung von Geräten und Lösungen bei Arbeiten mit RNS.....	117
5.4.5	Isolierung von Gesamt-RNS mittels CsCl-Dichtegradientenzentrifugation ...	118
5.4.6	Isolierung von RNS mittels "SV Total RNA Isolation System".....	119
5.4.7	Konzentrationsbestimmung von RNS.....	119
5.5	Nukleinsäureanalytik.....	119
5.5.1	Restriktion.....	119
5.5.2	Makrorestriktion.....	120
5.5.3	Aufreinigung von Nukleinsäuren.....	120
5.5.4	Klonierung von DNS-Fragmenten.....	120
5.5.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	121
5.5.6	Reverse Transkription.....	122
5.5.7	RACE-PCR "Rapid Amplification of cDNS-5`ends".....	123
5.5.8	Aufreinigung von PCR-Produkten.....	123
5.5.9	Agarosegel-elektrophoretische Analyse von Nukleinsäuren.....	124
5.5.10	Elution von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen.....	125
5.5.11	Sequenzanalyse von Plasmiden und Cosmiden.....	125
5.6	Konjugation von Plasmiden.....	126
5.7	Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNS.....	126
5.8	DNS-DNS-Hybridisierung.....	128

5.9	Expressionsversuche .....	130
5.9.1	Identifikation von Promotoren .....	130
5.9.2	Bestimmung der Promotoraktivitäten .....	130
5.10	Expressions- und Aktivitätsnachweis verschiedener plasmidcodierter Proteine ...	131
5.10.1	Colicin-Assay .....	131
5.10.2	Siderophoren-Assay .....	132
5.11	Zellkultur-Versuche .....	132
5.11.1	Adhäsions-Assays .....	132
5.11.2	Invasions-Assays .....	133
5.11.3	Färbungen der Zellkulturen .....	133
5.12	<i>In vivo</i> -Assays .....	134
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>135</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>150</b>
	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>165</b>
	<b>Summary .....</b>	<b>166</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>167</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Klassifizierung von *E. coli*-Stämmen

Entsprechend ihrer genetischen und klinischen Signifikanz erfolgt die Klassifizierung von *E. coli*-Varianten in die drei Gruppen der kommensalen, intestinal pathogenen (IPEC) und extraintestinal pathogenen *E. coli*-Stämme (ExPEC) (Russo & Johnson, 2000). **Kommensale *E. coli*-Stämme** rufen im Wirt keine Erkrankungen hervor (Russo & Johnson, 2003). Sie gehören normalerweise zu den Erstbesiedlern des Darmtraktes von Menschen und warmblütigen Tieren (Säugetiere und Vögel) und zählen damit zur physiologischen Darmflora. Als Kommensalen der Darmflora besitzen sie, aufgrund ihrer metabolischen Stoffwechselbeiträge, eine positive Bedeutung für den Wirt und tragen zudem wesentlich zum Schutz vor der Ansiedlung und Vermehrung pathogener Keime bei (Russo & Johnson, 2003; Picard et al., 1999).

**Intestinal pathogene *E. coli*-Stämme (IPEC)** werden oral durch kontaminierte Lebensmittel und Wasser, sowie durch Kontakt auf den Menschen übertragen und induzieren hier Darminfektionen verbunden mit Diarrhö (Nataro & Kaper, 1998). Insgesamt sind zurzeit sieben intestinale *E. coli*-Pathotypen bekannt: EaggEC (Enteraggregative *E. coli*), EIEC und *Shigella* (Enteroinvasive *E. coli*), EPEC (Enteropathogene *E. coli*), ETEC (Enterotoxische *E. coli*), DAEC (Diffus adhärente *E. coli*), NTEC (Nekrotoxische *E. coli*) und EHEC (Enterohämorrhagische *E. coli*) (Donnenberg & Whittam, 2001; Nataro & Kaper, 1998). Die Nomenklatur der Enterohämorrhagischen *E. coli* bezeichnet klinische Isolate als EHEC, während aus Lebensmitteln isolierte Stämme, aufgrund der EHEC-assoziierten Bildung von Shigatoxin, VTEC (Verotoxin-bildende *E. coli*) oder STEC (Shigatoxin-bildende *E. coli*) genannt werden (Busch et al., 2007). Jeder dieser Pathotypen weist eine charakteristische Kombination virulenzassoziierter Faktoren auf, die beim Menschen zu unterschiedlichen diarrhöassoziierten Symptomen führen, mit zum Teil systemischer Ausprägung (z. B. EHEC induziertes „Hämolytisch Urämische Syndrom“ [HUS]) (Karmali et al., 1983). Während intestinal pathogene *E. coli* beim Menschen i. d. R. pathogen sind, treten beim Tier Unterschiede im klinischen Erscheinungsbild auf. Neben Stämmen, die mit Tierpathogenität assoziiert sind, gelang auch der Nachweis von intestinal pathogenen *E. coli*, die Tiere offenbar ohne klinische Manifestation zu ihrer Verbreitung nutzen (Nataro & Kaper, 1998). **Extraintestinal pathogene *E. coli* (ExPEC)** verursachen diverse Infektionen außerhalb des Gastrointestinaltraktes. Sie unterscheiden sich phylogenetisch und epidemiologisch von intestinal pathogenen Stämmen und rufen keine Erkrankungen des Darms hervor, obwohl der



Anteil nachweisbarer ExPEC in der Fäkalflora gesunder Menschen bis zu 20 % betragen kann (Russo & Johnson, 2003; Johnson & Russo, 2002; Russo & Johnson, 2000). Ähnlich den kommensalen *E. coli*-Stämmen bedingen ExPEC nur ein asymptomatisches Auftreten im Intestinaltrakt, können aber im Gegensatz zu den Kommensalen, aufgrund einer Vielzahl virulenzassoziierter Faktoren, mit Übertritt in einen extraintestinalen Bereich des Körpers schwerwiegende Erkrankungen hervorrufen (Johnson et al., 2002b; Picard et al., 1999). Die häufigsten Erkrankungsformen des Menschen sowie domestizierter Tiere (z. B. Hühner, Rinder und Schweine) und Haustiere (z. B. Hunde und Katzen) durch ExPEC betreffen den Harntrakt, das Blut-, zentrale Nerven- und respiratorische System (Brzuszkiewicz et al., 2006; Maynard et al., 2004; Dezfulian et al., 2003; Dho-Moulin & Fairbrother, 1999). Ausgehend von lokalen Infektionsherden der Niere (Harnwegsinfektion), der Lunge (Pneumonie) oder auch der Haut (Cellulitis) treten ExPEC leicht in den Blutstrom des Wirtes über und können hier infolge ihrer Vermehrung zu einer Vielzahl von Entzündungen und koagulierenden Reaktionen führen, die eine Dysfunktion des Blutes und schließlich den Ausfall von Organen zur Folge haben (Sepsis) (Annane et al., 2005).

## **1.2 Durch ExPEC induzierte Krankheiten bei Mensch und Tier**

### **1.2.1 Neugeborenen-Meningitis hervorrufende *E. coli* (NMEC)**

Die durch pathogene *E. coli* induzierte bakterielle Meningitis betrifft in erster Linie Säuglinge und Kleinkinder, weshalb die Isolate als Neugeborenen-Meningitis hervorrufende *E. coli* (NMEC) bezeichnet werden (Stoll et al., 2005; Martin et al., 2003). Untersuchungen am NMEC-Isolat C5 (O18:H7:K1) haben gezeigt, dass verschiedene äußere Membranproteine, die K1-Kapsel und O-Lipopolysaccharide dem Stamm helfen, sich dem bakteriziden Effekt des Wirtsserums zu entziehen (Negre et al., 2004; Xie et al., 2004). Verschiedene Chelatoren machen zudem eine Vermehrung des Pathogenen unter den eisenlimitierten Bedingungen des Blutes möglich (Negre et al., 2004). Mit dem Ausmaß der entstehenden Bakteriämie korreliert die klinische Manifestation der Meningitis, die oberhalb einer Infektionsdosis von  $10^3$  Bakterien pro ml Blut erst möglich wird (Kim, 2001). Über das Blut gelangen die Bakterien dabei zu den Mikrovaskular-Endothelzellen des Gehirns (BMEC), an die sie, je nach NMEC-Isolat, mit Hilfe verschiedener Adhäsine binden (Xie et al., 2004; Kim, 2003). Für die Überwindung der Blut-Hirnschranke spielen ebenfalls eine Vielzahl unterschiedlicher Genprodukte eine Rolle, die zum Teil in der 20,3 kb große genetische Pathogenitätsinsel (PAI) *GimA* codiert sind (siehe Tab. 2) und zuerst bei dem NMEC-Stamm RS218 (O18:K1:H7; [Acc. AF289032]) nachgewiesen wurde (Huang et al., 2001). In einem durch

die Verfügbarkeit von Kohlenstoff regulierten Prozess überwinden die Bakterien unter Beteiligung einer Vielzahl bakterieller Invasine, die zu Umlagerungen des Aktin-Zytoskeletts führen, zunächst die BMEC und dann die Meninge und treten in das zentrale Nervensystem des Wirtes ein (Xie et al., 2004; Kim, 2001). Kinder, die diese Infektion überleben, weisen in der Regel schwere neurologische und entwicklungsbiologische Schäden auf (Kimberlin, 2002).

### **1.2.2 Uropathogene *E. coli* (UPEC)**

Harnwegsinfektionen werden durch uropathogene *E. coli*-Stämme (UPEC) induziert, wobei das Ausmaß der Infektion wesentlich von Art und Anzahl der virulenzassoziierten Faktoren des UPEC und dem Alter der erkrankten Person abhängt. Die Infektion verursacht häufiger Komplikationen bei Menschen über dem 65-igsten Lebensjahr, die den Erreger infolge einer infektdisponierenden Grunderkrankung aus früheren Jahren oder aber durch eine nosokomial erworbene Infektion aufweisen (Russo & Johnson, 2003). Die Expression von Adhäsinen ermöglicht die Besiedelung des Urogenitaltraktes durch das pathogene Bakterium. Weitere Virulenzfaktoren induzieren daraufhin die Aufnahme des UPEC in die Epithelzellen der Blase, wodurch die Immunabwehr des Wirtes unterwandert wird. In den Epithelzellen vermehren sich die Bakterien und exprimieren verstärkt Chelatoren und Toxine, die die Versorgung des UPEC mit essentiellen Spurenelementen sicherstellen und gleichzeitig den Wirt durch zytotoxische Schädigung schwächt. Durch die Entzündungsreaktion der Epithelzellen wird eine starke Cytokinantwort (IL-6, IL-8) des Wirtes induziert, die letztendlich für die Symptome der Harnwegsinfektion verantwortlich ist (Marrs et al., 2002; Russo et al., 2002; Johnson et al., 2001a; Torres et al., 2001). Genomanalysen der UPEC-Stämme 536 [Acc. NC\_008253], J96 [Acc. M10133] und CFT073 [Acc. NC\_004431] haben gezeigt, dass die virulenzassoziierten Faktoren häufig auf PAIs (siehe Tab. 2) codiert vorliegen und innerhalb des UPEC-Pathotyps eine gewisse Stammspezifität aufweisen (Bidet et al., 2005; Dobrindt et al., 2002; Guyer et al., 1998; Swenson et al., 1996).

### **1.2.3 Aviäre pathogene *E. coli* (APEC)**

Durch UPEC- und septikämische *E. coli*-Isolate induzierte Harnwegsinfektionen, Bakteriämie und Sepsis lassen sich auch bei Haustieren und Nutztieren diagnostizieren (Maynard et al., 2004; Johnson et al., 2003b). Speziell bei Geflügel treten des Weiteren Infektionen auf, die durch aviäre pathogene *E. coli* (APEC) hervorgerufen werden und zur Colibakteriose führen. Die Colibakteriose bedingt vor allem bei Legehennen in der Spitze ihrer Legeleistung aufgrund hoher Morbiditäts- und Mortalitätsraten erhebliche wirtschaftliche Verluste (Dho-

Moulin & Fairbrother, 1999). Nach derzeitiger Auffassung erfolgt eine Übertragung des Erregers vertikal über die mit Kot verunreinigte Eierschale oder horizontal durch Einatmen erregerrhaltigen Staubes, direkten Kontakt mit erkrankten Tieren (Hautverletzungen) oder durch die Aufnahme von Kot verunreinigtem Futter bzw. Trinkwasser. Der Erreger gelangt auf einen bisher unbekannten Weg in die Blutbahn und verursacht hier eine systemische Erkrankung, die als Coliseptikämie bezeichnet wird. Die Erkrankung geht mit entzündlichen Veränderungen nahezu aller inneren Organe und Membranen (Perikarditis, Aerosacculitis, ebenso wie Enteritis, Koligranulomatose, Meningitis, Omphalitis, Osteomyelitis/Synovitis, Perihepatitis, Salpingitis, "Swollen-Head-Syndrom" und "Yolk-Sac-Disease") einher (Barnes, 1999; Gross, 1994). Coliseptikämie ist weltweit eine Hauptursache für Leistungsminderung und Tierverluste in der Geflügelindustrie.

Seitdem der Nachweis von ExPEC-Isolaten gleichermaßen bei Tier und Mensch gelang, wird die Möglichkeit einer Übertragung von tierischen Stämmen auf den Menschen diskutiert. Untersuchungen von Geflügelfleischproben, die stichprobenartig aus dem Einzelhandel gezogen worden waren, hatten eine hohe Nachweisrate von APEC zur Folge. Aus diesem Grund wurde erstmals in Betracht gezogen, dass APEC infolge einer unsachgemäßen Behandlung von Geflügelfleisch auf den Menschen übertragen werden könnten (Johnson et al., 2005a). Dass APEC nach oraler Aufnahme die Magensäure überstehen, ist gegenwärtig nicht bewiesen. Aber es gibt bereits einige Versuchsergebnisse, die eine erhöhte Säureresistenz des untersuchten APEC-Isolates bestätigten (Sabri et al., 2006). Sollte die Möglichkeit einer Übertragung von APEC auf den Menschen bestehen, erhöht sich damit die Gefahr, dass diese im Darm nicht nur als Reservoir für virulenzassoziierte Faktoren humanpathogener ExPEC-Stämme dienen, sondern darüber hinaus möglicherweise selbst an extraintestinale Infektionen beim Menschen beteiligt sind (Ron, 2006; Germon et al., 2005; Schouler et al., 2004). Weitere Studien und epidemiologische Untersuchungen zur Klärung der Frage nach dem zoonotischen Potential von APEC sind damit unbedingt notwendig.

### 1.3 Virulenzassoziierte Gene von ExPEC

Die unterschiedlichen ExPEC induzierten Erkrankungen sowohl von Mensch als auch Tier haben zu der Frage geführt, inwiefern sich diese Stämme geno- und phänotypisch derselben Pathogruppe zuordnen lassen. Umfangreiche Stammsammlungen von human-, tier- und vogelpathogenen *E. coli*-Isolaten wurden aus diesem Grund systematisch hinsichtlich ihrer virulenzassoziierten Gene, ihrer Phylogenie und Serologie verglichen und entsprechend der EcoR(*E. coli* Referenzsammlung)-Einteilung eingruppiert (Moulin-Schouleur et al., 2006; Ron, 2006; Rodriguez-Siek et al., 2005). Bei den EcoR-Referenzstämmen handelt es sich um

72 archetypische *E. coli*-Stämme, die aus Stuhlproben gesunder Menschen, aus Patienten mit Harnwegsinfektionen sowie aus verschiedenen Tieren isoliert und entsprechend den Ergebnissen der „Multilokus-Enzym-Elektrophorese“ (MLEE) in die vier phylogenetische Hauptgruppen A, B1, B2 und D eingeteilt wurden (Herzer et al., 1990; Selander et al., 1986). Die Einordnung der humanen und tierpathogenen ExPEC-Isolate in die EcoR-Hauptgruppen erfolgte nach Anwendung verschiedenster Analysetechniken und bestätigte nicht nur phäno-, sondern auch genotypische Übereinstimmungen dieser Pathogruppe. Der überwiegende Anteil der Isolate konnte der EcoR-Gruppe B2 und den Sero- bzw. O-Typen O1:K1, O2:K1, O18:K1 oder O78 zugeordnet werden (Picard et al., 1999). UPEC, NMEC und APEC exprimieren identische und funktionell ähnliche virulenzassoziierte Faktoren, was sie von ihrer genetischen Ausstattung gleichermaßen zu Krankheitserregern extraintestinaler Räume macht (Russo & Johnson, 2000). Zu diesen Faktoren zählen Adhäsine, Eisenaufnahmesysteme, Toxine, Polysaccharidkapseln und Oberflächenantigene. Die in der Tab. 1 aufgeführten Faktoren gelten aufgrund ihrer Nachweishäufigkeit innerhalb der ExPEC als spezifische "Virulenzmarker" dieser Pathogruppe (Ewers et al., 2007; Johnson & Russo, 2002).

Obwohl die APEC-, UPEC- und NMEC-Stämme aus allen Wirtsgruppen große genfaktorielle Übereinstimmungen zeigen, treten gleichzeitig wiederum wesentliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Serotypen eines Pathotyps auf. Der Vergleich von Fimbrienadhäsinen und Kapselantigenen ergab, dass O2-Stämme F1C-Fimbrien und K1-Antigene exprimieren, während Stämme des O78 Serotyps AC/I-Fimbrien und eine Typ IV-Kapsel produzieren. Weitere Differenzen zwischen dem molekularbiologisch ermittelten Datensatz von O2- und O78-Stämmen deuten auf insgesamt große entwicklungsgeschichtliche Unterschiede hin. Demnach treten bei den Serotypen eines Pathotyps verschiedene alternative Virulenzfaktoren auf, die nach dem „mix-and-match“ Prinzip miteinander kombiniert werden und letztendlich dieselbe Erkrankung hervorrufen (Germon et al., 2007; Brzuszkiewicz et al., 2006). Damit kann geschlussfolgert werden, dass das Vorkommen von virulenzassoziierten Genen unabhängig vom Wirtsorganismus ist, so dass ExPEC-Stämme des gleichen Wirtes durchaus unterschiedliche Gene tragen können, während umgekehrt Stämme aus verschiedenen Wirten mit gleichen Genen ausgestattet sind (Adiri et al., 2003).

Tab. 1 Virulenzassoziierte Faktoren, die im Zusammenhang mit der Pathogruppe der extraintestinal pathogenen *E. coli* stehen.

Faktorklasse	Virulenzassoziiertes Faktor	Genotyp (Lokalisation)
<b>Adhäsine</b>	Typ 1-Fimbrien	<i>fim</i> -Gen-Cluster (Chromosom)
	P-Fimbrien	<i>pap</i> -Gen-Cluster (Chromosom)
	S- bzw. F1C-Fimbrien	<i>sfaS/foc</i> (Chromosom)
	G-Fimbrien	<i>gafD</i> (Chromosom)
	M-Fimbrien	<i>bmaE</i> (Chromosom) <i>iha</i> (Chromosom)
	Dr-Antigen-bindendes Adhäsins	<i>afa/dra</i> (Chromosom)
	Curli	<i>csg</i> -Gen-Cluster (Chromosom)
<b>Toxine</b>	Hämolysin A	<i>hlyA</i> (Chromosom)
	Zytotoxischer Nekrosefaktor 1	<i>cnf1</i> (Chromosom)
	Zytolethales Toxin, B-Untereinheit	<i>cdtB</i> (Chromosom)
	Vakuolisierendes Autotransporter-Toxin	<i>vat</i> (Chromosom)
<b>Eisenaufnahmesysteme</b>	Aerobaktin, Eisenaufnahmesystem	<i>iuc</i> -Gen-Cluster (Plasmid)* <sup>1</sup>
	Yersiniabaktin, Eisenaufnahmesystem	<i>fyuA, irp2</i> (Chromosom)
	Salmocheilin, Eisenaufnahmesystem	<i>iro</i> -Gen-Cluster (Plasmid)* <sup>1</sup>
	Eisenreguliertes äußeres Membranprotein	<i>ireA</i> (Chromosom)
	Hämin- und/oder Hämoglobin-Rezeptor	<i>chuA</i> (Chromosom)
<b>Invasine</b>	Äußeres Membran/Invasionsprotein	<i>ibeA</i> (Chromosom)
	Toxischer Invasionslokal	<i>tia</i> (Chromosom)
	Mit Neugeborenen-Meningitis assoziierte genetische Insel	<i>gimB</i> (Chromosom)
<b>Kapsel (K)-Antigene</b>	Kapselpolysaccharid (Gruppe 2), Transportprotein	<i>kps</i> -Gen-Cluster (Chromosom)
<b>Serum-/Komplementresistenz</b>	TraT, Transportprotein der äußeren Membran	<i>traT</i> (Plasmid)
	Iss („increased serum survival protein“)	<i>iss</i> (Plasmid)* <sup>1</sup>
	Äußere Membranprotease A	<i>ompA</i> (Chromosom)
	Colicin V-Strukturgene	<i>cva</i> -Gen-Cluster (Plasmid)* <sup>1</sup>
	PAI <sub>CFT073</sub> -Marker* <sup>2</sup>	<i>malX</i> (Chromosom)

\*<sup>1</sup> Diese Gene sind überwiegend auf Plasmiden lokalisiert, können aber auch als Bestandteil chromosomal determinierter Pathogenitätsinseln auftreten. \*<sup>2</sup> PAI<sub>CFT073</sub> (Pathogenitätsinsel des UPEC-Stammes CFT073)

Die genetische Flexibilität der verschiedenen virulenzassoziierten Faktoren der ExPEC ist wesentlich an deren Lokalisation auf genetischen Inseln oder anderen mobilen genetischen Elementen gekoppelt (Dobrindt, 2005). Vergleichende Genomanalysen von zwei apathogenen *E. coli* K12-Stämmen (MG1655 [Acc. NC\_000913], DH10B [Acc. NC\_010473]) mit sequenzanalysierten human- und tierpathogenen ExPEC-Isolaten machen deutlich, dass die

apathogenen und pathogenen Stämme sich in ihrem „Kerngenom“ stark ähneln, während ihre Unterschiede auf einen „flexiblen Genpool“ zurückzuführen sind (Johnson et al., 2007b; Brzuszkiewicz et al., 2006; Johnson et al., 2006c; Rutherford et al., 2000). Das 4,6 bis 5,5 Megabasenpaar große Kerngenom der verschiedenen *E. coli*-Stämme weist Gene mit wichtigen stoffwechselmetabolischen Funktionen auf, während dem flexiblen Genpool transponierbare Elemente, wie Plasmide, Bakteriophagen, IS-Elemente, Transposons und Pathogenitätsinseln zuzuordnen sind (Dobrindt, 2005; NCBI).

## 1.4 Transponierbare Elemente der ExPEC

### 1.4.1 Pathogenitätsinseln (PAIs)

Der flexible Genpool mit gleichen und unterschiedlichen Genomsequenzen innerhalb der ExPEC, deutet auf ein tendenziell hohes Mobilitätsvorkommen von transponierbaren Sequenzen innerhalb dieser Pathogruppe hin. Hierzu zählen sowohl vollständige als auch partielle Pathogenitätsinseln (PAIs), die eine Vielzahl an Faktoren mit virulenzassoziierten Eigenschaften codieren können. Untersuchungen von PAIs haben folgende Charakteristika dieser Inseln ergeben:

- a) es handelt sich um ~10-200-kb große genomische Regionen,
- b) ihr G + C-Gehalt unterscheidet sich von dem restlichen chromosomalen Genom,
- c) sie beinhalten ein oder mehrere virulenzassoziierte Gene,
- d) sie sind flankiert durch kryptische oder funktionelle mobile genetische Elemente (MGEs), wie Transposasen, Integrasen, direkten Wiederholungs- („direct repeats“, DR) oder Teilen von Insertionssequenzen (IS) und
- e) liegen häufig instabil im Genom vor (Hacker et al., 1997).

IS-Elemente, Transposons und Bakteriophagen ermöglichen die Transposition von PAI-Sequenzen, durch deren Insertion ein avirulenter in einen virulenten Stamm transformiert werden kann (van Elsas & Bailey, 2002). Diese mobilen Elemente spielen nicht nur bei dem Transfer von PAIs zwischen den Bakterienspezies eine Rolle, sondern ermöglichen auch nach der Insertion noch Rearrangements verschiedener Elemente innerhalb der PAI (Hochhut et al., 2006). Die Neuordnung von DNS-Sequenzen spielt eine wichtige Rolle in der Evolution von Pathogenen. Sie können eine veränderte Genregulation zur Folge haben oder durch Deletionen und Punktmutationen von Mobilitätsgenen oder DR-Sequenzen in einer relativ stabilen Assoziation der PAI mit dem Wirtschromosom resultieren (Hacker & Kaper, 2000). Innerhalb der ExPEC-Pathogruppe wird die Mobilität der PAIs, sowie deren Verbindung zu

Plasmiden bei Sequenzen deutlich, die sich im Chromosom und auf Plasmiden der verschiedenen Pathotypen nachweisen lassen (Dobrindt et al., 2002). Bei den NMEC exprimieren die Isolate eine Vielzahl unterschiedlicher Faktoren zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke, zu denen auch die Gene des S-Fimbrien-Adhäsins (*sfaS*), des zytotoxischen Nekrosefaktors 1 (*cnf1*) und der Invasions-Determinante der genetischen Insel GimA (*ibeA*) gehören, die auf verschiedenen PAIs der charakterisierten NMEC angeordnet sind (Bonacorsi et al., 2003) (siehe Tab. 2). Eine für den UPEC-Stamm 536 beschriebene PAI III<sub>536</sub> weist innerhalb des transolzierbaren Sequenzelementes das *iro*-Gencluster (Salmochelin) und *sfaS* auf, während bei APEC-Stämmen das *iro*-Gencluster häufig genetischer Bestandteil von ColV-Plasmiden ist und *sfaS* nur selten nachgewiesen wird (Girardeau et al., 2003; Achtman et al., 1983). *ibeA* und *gimB* sind ebenfalls genetischer Bestandteil von chromosomal determinierten PAIs in APEC- und UPEC-Stämmen, während *cnf1* so gut wie gar nicht in APEC, sondern nur in UPEC und NMEC nachzuweisen sind. Andersherum konnten auch Gene (*ireA*, das *pap*-Operon und der Invasions-Lokus *tia*), die zuerst in der PAI I des APEC-Stammes APEC-O1 nachgewiesen wurden, im Nachhinein auch im Chromosom von NMEC- und UPEC-Isolaten aufgezeigt werden (Ewers et al., 2007; Kariyawasam et al., 2006a).

Tab. 2 Pathogenitätsinseln von ExPEC-Isolaten

<b><i>E. coli</i>-Stamm</b>	<b>Serotyp</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Größe (kb)</b>	<b>Kodierende Merkmale</b>	<b>Referenz</b>
536 (UPEC)	O6:K15:H34	PAI I <sub>536</sub>	78,5	α-Hämolysin, putatives Adhäsins	(Dobrindt et al., 2002)
		PAI II <sub>536</sub>	102	α-Hämolysin, Hämagglutinin ähnliches Adhäsins, P-Fimbrie	(Dobrindt et al., 2002)
		PAI III <sub>536</sub>	76,8	Tsh-ähnliche Hämoglobin-protease, Salmochelin, S-Fimbrie, SAP-Adhäsins, HmuR-ähnlicher Hämrezeptor	(Dobrindt et al., 2002)
		PAI IV <sub>536</sub>	> 75	K12-Kapsel, Sit-Operon, Eisenaufnahme	(Schneider et al., 2004)
J96 (UPEC)	O4:K-:H5	PAI I <sub>J96</sub>	> 170	α-Hämolysin, P-Fimbrie	(Swenson et al., 1996)
		PAI II <sub>J96</sub>	> 110	α-Hämolysin, P-Fimbrie, Zytotoxischer Nekrosefaktor1 hitzeresistentes Hämagglutinin	(Bidet et al., 2005; Swenson et al., 1996)

Fortsetzung Tab. 2 Pathogenitätsinseln von ExPEC-Isolaten

<b><i>E. coli</i>-Stamm</b>	<b>Serotyp</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Größe (kb)</b>	<b>Kodierende Merkmale</b>	<b>Referenz</b>
CFT073 (UPEC)	O6:K2:H5	PAI I <sub>CFT073</sub>	58	α-Hämolysin, P-Fimbrie, Aerobaktin	(Welch et al., 2002; Kao et al., 1997)
		PAI II <sub>CFT073</sub>	71	Sit-Operon, P-Fimbrie	(Welch et al., 2002; Rasko et al., 2001)
C5 (NMEC)	O18:K1:H7	PAI <sub>C5</sub>	~ 100	α-Hämolysin, P-Fimbrie, Zytotoxischer Nekrosefaktor1 hitzeresistentes Hämagglutinin	(Houdouin et al., 2002)
RS 218 (NMEC)	O18:K1:H7	GimA	~ 20	PTS-System, Glyoxylat-Synthese, Glycerol-Metabolismus, IbeRAT	(Huang et al., 2001)
APEC_O1 (APEC)	O1	PAI I <sub>APEC O1</sub>	67	Eisenrezeptor, P-Fimbrie, Invasion	(Kariyawasam et al., 2006b)
BEN2908 (APEC)	O2:K1:H5	AGI-3	49,6	Kohlenhydrat-Assimilation, Transporter MFS-Superfamilie, Glykosidase Transkriptions-Regulator der LacI-Familie	(Chouikha et al., 2006)

### 1.4.2 Plasmide

#### Struktur von Plasmiden

Plasmide sind per Definition nicht-essentielle, extrachromosomale DNS, die in der Wirtszelle ringförmig mit einer Größe von ein bis mehreren 100 Kilobasenpaaren auftreten (Thomas, 2000). Plasmide können sich autonom vom Wirtschromosom replizieren und z. T. auch eigenständig in andere Bakterienzellen übertragen (Thomas, 2000). Plasmideigene Gene, die die Replikation initiieren, die Anzahl der Kopien pro Bakterienzelle, die Auftrennung doppelsträngiger Plasmid-DNS und die nachfolgende Überführung des einzelnen Plasmidstranges in die Tochterzelle kontrollieren gehören ebenso, wie eine Vielzahl weiterer Gene deren Produkte die Weitergabe des Plasmids zwischen den Generationen sicherstellen („post-segregation killing system“) zur Kernregion (Osborn, 2000).

Obwohl Plasmide als nicht-essentiell gelten, können sie in nahezu allen natürlich vorkommenden Bakterienspezies nachgewiesen werden, wo ihr langfristiges Vorkommen wesentlich an ihre Nützlichkeit für das Bakterium gekoppelt ist (Lilley et al., 2000; Amabile-Cuevas & Chicurel, 1992). Unter den am weitesten verbreiteten und mit am besten untersuchten Plasmidgruppen befinden sich die Resistenzplasmide (R-Plasmide), die dem Bakterium Resistenzen gegen Antiinfektiva und andere Wachstumsinhibitoren (z. B.



Quecksilber, Cadmium, Nickel, Cobalt, Zink und Bakteriozine) verleihen und häufig auf MGEs lokalisiert sind (Ricci & Hernandez, 2000). Das Auftreten der Resistenzeigenschaften auf MGEs von konjugativen Plasmiden erklärt deren enorme Verbreitungsmöglichkeit. Plasmide sind dadurch in der Lage, ähnlich infektiösen Agenzien, ihre Resistenzeigenschaften auf eine geeignete Bakterienpopulation zu übertragen und dadurch z. B. die Eigenschaften der physiologischen Darmflora von Mensch und Tier wesentlich zu verändern (www.sciencedaily.com/releases/2007/06/070619165543.htm, 2007; Levy & Marshall, 2004; van Elsas, 1992; Levy, 1982). Konjugative Eigenschaften, gekoppelt mit der höheren genetischen Flexibilität von Plasmiden hat aufgrund des unkritischen Einsatzes von Antibiostatika zur Ausbildung von plasmidcodierten Multiresistenzen geführt. Diese bedingen weltweit bereits große Probleme in der Human- und Tiermedizin, da die herkömmlich durchgeführten Therapieformen immer häufiger erfolglos bleiben.

Neben der Kernregion und den MGEs haben Sequenzanalysen von umwelt- und klinisch-relevanten Plasmiden gezeigt, dass offenbar zudem große DNS-Abschnitte mit nicht-codierenden, unbekannten oder funktionslosen Sequenzen auftreten. Die Bedeutung dieser DNS-Sequenzen ist noch unklar im Verständnis der Plasmidbiologie. Möglich wäre, dass der DNS-Anteil trotz energetisch schlechter Bilanz mitgeführt wird, um ohne große Auswirkungen auf das Plasmidkerngenom flexibel Genmaterial austauschen zu können (Osborn, 2000).

### **Klassifizierung von Plasmiden**

Die Klassifizierung von Plasmiden kann durch unterschiedliche Methoden erfolgen. Neben der phänotypischen und sequenzanalytischen Charakterisierung von Plasmiden, kann die Einordnung auch infolge von Inkompatibilitätstests und der Typisierung von Plasmid-replikons erfolgen (Couturier et al., 1988). Die am häufigsten genutzte Methode testet die Inkompatibilität von Plasmiden, auf deren Basis über 40 verschiedene Plasmidgruppen identifiziert werden konnten, von denen alleine 26 innerhalb der Familie der *Enterobacteriaceae* zu finden sind (Guiney, 1993). Die Klassifizierung von Plasmiden infolge ihrer Inkompatibilität basiert auf der Erkenntnis, dass mehrere Plasmide der gleichen Inkompatibilitätsgruppe nicht in einer Bakterienzelle auftreten können, da ihre Replikation durch dieselben Genprodukte kontrolliert wird, was zum Verlust eines der Plasmide in der Bakterienpopulation führt (Madigan et al., 2001). Neuere Untersuchungen zur Inc-Verteilung von über 1.000 Plasmiden aus humanen und aviären apathogenen *E. coli*-Stämmen sowie aus APEC und UPEC hatten überwiegend den Nachweis der Amplikons IncFIB und IncFrep zur Folge. IncFIB wiederum trat im Zusammenhang mit dem Nachweis des Colicin V-Operons

signifikant häufiger bei Plasmiden von APEC-Isolaten als bei den Plasmiden der anderen untersuchten *E. coli*-Stämme auf.

### **Bedeutung von Plasmiden bei ExPEC-Stämmen**

Auf der Suche nach genetischen Determinanten, die die spezifische Infektion verschiedener extraintestinaler Bereiche ermöglichen, wird seit nun mehr über 80 Jahren hauptsächlich an humanpathogenen Isolaten geforscht. Erst innerhalb der letzten sechs Jahre sind die vogel- bzw. tierpathogenen ExPEC-Stämme mit Hinblick auf ihr mögliches zoonotisches Potential verstärkt in den Fokus molekularbiologischer Untersuchungen gerückt. Humane Isolate aus dem Blut von Patienten mit Bakteriämie, wiesen in den meisten Fällen 80-180 kb große Plasmide auf (Fernandez-Beros et al., 1990), die sich auch bei septikämischen Isolaten der Tiermedizin nachweisen ließen. Genomanalysen eines APEC O1- [Acc. NC\_008563] und der UPEC-Isolate 536 [Acc. NC\_008253] und CFT073 [Acc. NC\_004431] ermöglichen zusammen mit den vollständig sequenzanalysierten Plasmiden dieser Pathotypen eine detailliertere Charakterisierung der Bedeutung von ExPEC-Plasmiden unter Berücksichtigung des chromosomalen Genoms. Mittlerweile liegen sieben vollständig sequenzanalyzierte Plasmide vogelpathogener Isolate (pAPEC-O1-R [Acc. DQ517526], pAPEC-O1-ColBM [Acc. DQ381420], pAPEC-O2-R [Acc. AY214164], pAPEC-O2-ColV [Acc. NC\_007675], pVM01 [Acc. NC\_010409], pAPEC-O103-ColBM [Acc. NC\_011964] und pAPEC-1 [NC\_011980]) sowie drei Plasmide uropathogener (UTI89 [Acc. NC\_007941], 1658/97 [Acc. AF550679], p15C1a [Acc. NC\_005327]) *E. coli*-Stämme vor. Hinzu kommt eine Vielzahl geno- und phänotypischer Informationen über verschiedene virulenzassoziierte Faktoren (Serumresistenz vermittelndes Protein (Iss), Temperatursensitives Hämagglutinin (Tsh), Aerobaktin, Salmochelin-, Sit-Operon etc.) von Plasmiden aviären (pO78V etc.) und humanen (pColV-K30 [Acc. AJ223631] und pColV,I-K94) Ursprungs (siehe Tab. 3). Des Weiteren liegt die vollständige Sequenz eines ColM-Plasmids (pSMS35\_130 [Acc. NC\_010488]) aus einem *E. coli*-Isolat der Umwelt vor (Fricke et al., 2008). Dieser Stamm konnte aus dem Gewässer eines Küstenbereiches der USA isoliert werden, das starke industrielle Verschmutzungen aufwies. Die Sequenzanalyse des ColM-Plasmids ergab, dass eine Reihe der typischerweise auf ColV-Plasmiden nachgewiesenen Gene fehlten, während stattdessen eine Vielzahl von Resistenzen gegen verschiedene Antiinfektiva codiert auf einer PAI vorliegen (siehe Tab. 4) (Fricke et al., 2008). Ein weiteres Colicin codierendes Plasmid konnte aus einer andern Bakterienspezies als *E. coli* isoliert werden. Bei *Salmonella enterica ssp. enterica* Serovar Kentucky (pCVM29188\_146 [Acc. CP001122]) erfolgte der Nachweis eines Colicin A codierenden Plasmids, auf dem sich die typischerweise

mit ColV-Plasmiden assoziierten Faktoren nachweisen ließen (siehe Tab. 4) (Ravel et al., 2008).

Die Erkenntnisse über Plasmide des NMEC-Pathotyp sind aufgrund der relativ niedrigen Erkrankungsrate in den Industrieländern noch gering. Ihre Untersuchung erfolgte zunehmend im Zusammenhang mit Prävalenzuntersuchungen von genetischen Determinanten der gesamten ExPEC-Pathogruppe. Die vollständige Sequenzinformation eines Plasmids aus einem NMEC-Isolat lag bis zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit jedoch noch nicht vor.

Tab. 3 Virulenzassoziierte Plasmide aus human- und tierpathogenen ExPEC-Isolaten

Plasmid	Größe (kb)	Genbank. (Acc. Nr.)	Stamm	Codierte Eigenschaften	Referenz
pColV-K30	144	AJ223631	<i>E. coli</i>	Colicin V, Konjugatives Plasmid (Tra-Region), IncFI, Hämoglobin-Protease	(Otto et al., 2002; Otto, 1998)
pColV,I-K94 (Teilsequenz)	–	–	<i>E. coli</i> (1829)	Produziert Colicin V-K94 und Colicin I-K94, konjugatives Plasmid (Tra-Region), IncFI, Iss, TraT	(Binns et al., 1979)
pAPEC-O2-ColV	185	NC_007675	APEC (O2)	ColicinV, konjugatives Plasmid (Tra-Region), IncFIIA, IncFIC, IncFIB, Iss, TraT, Sit-, Aerobaktin- und Salmochelin-Operon, Hämolysin F, Temperatursensitives Hämagglutinin (Tsh)	(Johnson et al., 2006c)
pAPEC-O2-R	101	AY214164	APEC (O2)	Konjugatives Plasmid (Tra-Region), IncA, vermittelt Resistenzen gegen Silbernitrat, Sulfonamide, Cm <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	(Johnson et al., 2005b)
pAPEC-O1-ColBM	174	DQ381420	APEC (O1)	Colicine BM, Konjugatives Plasmid (Tra-Region), IncFI, Iss, TraT, OmpA, Sit-, Aerobaktin- und Salmochelin-Operon, Hämolysin F, Temperatursensitives Hämagglutinin (Tsh)	(Johnson et al., 2006b)
pAPEC-O1-R	241	DQ517526	APEC (O1)	Konjugatives Plasmid (Tra-Region), IncH, vermittelt Resistenzen gegen Gentamycin, Sulfisoxazol, Kaliumtellurit, Silbernitrat, Kupfersulfat, Benzolkoniumchlorid, Stm <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup>	(Johnson et al., 2006d)
pAPEC-1	103	NC_011980	APEC (χ7122)	Colicin V, IncFIIA, IncFIC, IncFIB, Iss, Sit-, Aerobaktin- und Salmochelin-Operon, Hämolysin F, Temperatursensitives Hämagglutinin (Tsh)	(Mellata et al., 2009)
pTJ100 (Teilsequenz)	100	AY_553855	APEC (A2363)	Colicin V, Konjugatives Plasmid (Tra-Region), IncFI, Iss, TraT, Sit-, Aerobaktin- und Salmochelin-Operon, Temperatursensitives Hämagglutinin (Tsh), Amp <sup>R</sup> und Tet <sup>R</sup>	(Heimer et al., 2004)
pVM01	151	NC_010409	APEC (E3)	Colicin V, Sit-, Aerobaktin- und Salmochelin-Operon Hämolysin F, Temperatursensitives Hämagglutinin (Tsh)	(Tivendale et al., 2005)
pAPEC-O103-ColBM	125	NC011964	APEC (103)	Colicine BM, IncFIIA, IncFIB, Iss, TraT, Salmochelin, Sit-Operon, Hämolysin F	(Johnson & Nolan, 2009)
pO78V (Teilsequenz)	80	–	APEC (789)	Colicin V, Konjugatives Plasmid (Tra-Region), IncFI und IncI, TraT, Typ IV-Pili	(Gophna et al., 2003)

Fortsetzung Tab. 3 Virulenzassoziierte Plasmide aus human- und tierpathogenen ExPEC-Isolaten

Plasmid	Größe (kb)	Genbank. (Acc. Nr.)	Stamm	Codierte Eigenschaften	Referenz
Plasmid E (Teilsequenz)	–	–	APEC (SEPT13)	Colicine Ia, Ib, E1, E3, K und B, Serumresistenz, Temperatursensitives Hämagglutinin (Tsh), afimbrielle Adhäsion, Amp <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> , Stm <sup>R</sup>	(Stehling et al., 2003)
pRK100 (Teilsequenzen)	100	–	UPEC (KS533)	Colicin V, konjugatives Plasmid (Tra-Region), IncFII, IncFIB, Iss, TraT, Aerobaktin, Salmochelin	(Starcic Erjavec et al., 2003)
p1658/97 (Teilsequenz)	125	AF550679	UPEC (1658/97)	Konjugatives Plasmid (Tra-Region), IncFII, IncFIB, erweiterte $\beta$ -Laktamantinfektiva-Resistenz, stabiler Plasmidtransfer	(Zienkiewicz et al., 2007)
pUTI89	114	NC_007941	UPEC (CFT073)	Konjugatives Plasmid (Tra-Region), IncFIB, IncA, Resistenz gegen Kupfersulfat, Enterotoxin, Hämrezeptor, stabiler Plasmidtransfer	(Chen et al., 2006)
pC15-1a	92	NC_005327	UPEC	Konjugatives Plasmid (Tra-Region), IncA, erweiterte $\beta$ -Laktamantinfektiva-Resistenz, Tet <sup>R</sup> , Aminoglykoside, stabiler Plasmidtransfer	(Boyd et al., 2004)
FC201 (Teilsequenz)	–	–	NMEC (FC001)	Colicin V, TraT	(Aguero et al., 1989)

Tab. 4 Colicin-produzierende Plasmide aus *Enterobacteriaceae*-Stämmen nicht-extraintestinalen Ursprungs

Plasmid	Größe (kb)	Genbank. (Acc. Nr.)	Stamm	Codierte Eigenschaften	Referenz
pSMS-3-5_130	130	NC_010488	<i>E. coli</i>	Konjugatives Plasmid (Tra-Region), IncFII, produziert Colicin M; Colicin B verkürzt, vermittelt Resistenzen gegen Sulfamid/Trimethoprim, Amp <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> , Stm <sup>R</sup> , Sit-Operon, Hämolyisin F	(Fricke et al., 2008)
pCVM29188_146	146	CP001122	<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> Serovar Kentucky	Colicin A, konjugatives Plasmid (Tra-Region), IncFII Iss, TraT, OmpT, Aerobaktin-, Salmochelin-, Sit-Operon Tet <sup>R</sup> , Hämolyisin F	(Ravel et al., 2008)

## 1.5 ColV-Plasmide

Die vergleichenden Untersuchungen des flexiblen Genoms von ExPEC-Isolaten haben gezeigt, dass die septikämischen Eigenschaften der tier- und humanpathogenen Isolate offenbar wesentlich an das Auftreten eines Colicin V codierenden Plasmids gekoppelt sind (Ron, 2006; Zgur-Bertok et al., 1990; Valvano et al., 1986; Warner et al., 1981). Colicine sind antibiotisch wirksame Proteine mit begrenztem Wirkspektrum. Um sie von den bakteriell ebenfalls produzierten Antiinfektiva mit breitem Wirtsspektrum zu unterscheiden, bezeichnet man sie als Bakteriozine (Madigan et al., 2001). Der toxische Effekt eines Bakteriozins ist begrenzt auf sensible Stämme innerhalb der Familie und wirkt am stärksten innerhalb der Spezies des produzierenden Stammes (Jeziorowski & Gordon, 2007). Trotz des Namens gehört Colicin V nicht zu der Gruppe der Coli-, sondern der Mikroazine (Baquero et al., 1978). Die Mikroazine unterscheiden sich in ihrer Größe und dem Aktivierungsmechanismus von den Colizinen (Hardy, 1975). Das Colicin V-Mikrozin ist mit 4 kDa ein deutlich kleineres Protein und wird zudem durch eisenlimitierende Bedingungen induziert exprimiert (Braun, 1995; Herschman & Helinski, 1967). Das Colicin V (ColV)-Operon umfasst in einer 4,2 kb großen Region die genetische Information für die vier Proteine Cvi, CvaA, CvaB und CvaC. Cvi gewährleistet die zelleigene Immunität gegen das ColV-Strukturprotein (CvaC), dass sich zunächst als primäres, 103 AS großes Translationsprodukt im Zytoplasma befindet. Die Translokation von CvaC erfolgt über ein ABC-Transportsystem bestehend aus CvaA, CvaB und TolC („Tolerance colicine E1 protein“). Während der Translokation erfolgt eine Prozessierung von CvaC in ein 88 AS großes Polypeptid, das über den äußeren Membran-Rezeptor Cir und den Proteinen des TonB-Aufnahmesystems (TonB, ExbB und ExbD) in die bakteriellen Zielzellen gelangt (Cursino et al., 2002).

Colicin V tötet sensitive Bakterienzellen, indem es ausgehend vom Periplasma in die innere Membran inseriert. Als porenbildendes Protein hat es den Austritt von zytoplasmatischen Ionen und kleineren Molekülen zur Folge, wodurch letztendlich die Ausbildung eines energieliefernden Membranpotentials verhindert wird. Die Gene des ColV-Operons lassen sich auch im Chromosom anderer Pathotypen der *Enterobacteriaceae* nachweisen. Die große genetische Übereinstimmung zwischen *E. coli* und *Shigella* beinhaltet auch die Gene der PAI SHI-2 im *selC*-Lokus des Chromosoms von *Shigella flexneri*, die das ColV- und Aerobaktin-Operon codieren (Waters & Crosa, 1991; Payne, 1989). Nähere Untersuchungen dieser Region haben allerdings gezeigt, dass durch *Shigella flexneri* kein Colicin V produziert, sondern nur eine Immunität gegen dieses Bakteriozin vermittelt wird (Moss et al., 1999). Das ebenfalls durch *Shigella flexneri* codierte Eisentransportsystem Aerobaktin weist mit über

90 % eine hohe Ähnlichkeit zu dem Plasmid-codierten Operon septikämischer *E. coli*-Isolate auf und steht offenbar ebenfalls wesentlich mit dessen Virulenz im Zusammenhang (Lawlor & Payne, 1984).

Konjugationsversuche mit dem ColV-Plasmid pO78V und den Akzeptorstämmen *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* und *Salmonella enterica ssp. enterica* Serovar Typhimurium ermöglichten nur mit sehr geringer Frequenz einen Transfer in *Klebsiella*. Bisher konnte mit *Salmonella enterica ssp. enterica* Serovar Kentucky nur eine andere Spezies mit einem Colicin A codierenden Plasmid nachgewiesen werden (Ravel et al., 2008), was darauf hindeutet, dass das Vorkommen der ColV-Plasmide offenbar spezifisch an virulenzassoziierte *E. coli*-Isolate gekoppelt ist. Neben dem Aerobaktin lassen sich auf ColV-Plasmiden häufig weitere eisenakquirierende Systeme (Siderophoren) nachweisen. Bakteriozine und Siderophoren stellen im Allgemeinen stoffwechselphysiologische Charakteristika von metabolischen Plasmiden aus Bakterien der Umwelt dar. Obwohl die Aufnahme von Metall-, speziell Eisenionen eine wesentliche Voraussetzung des Metabolismus von pro- und eukaryotischen Zellen ist, gilt eine Ansammlung mehrerer hochaffiner, extrazellulärer Eisen<sup>3+</sup>-Chelatoren bei Prokaryoten auch als Virulenzmerkmal (Hochhut et al., 2006). Ebenso als Virulenzfaktoren gelten Adhäsine und Serumresistenz vermittelnde Proteine, deren Zusammenhang mit ColV-Plasmiden in den nachfolgenden Abschnitten erläutert wird.

### 1.5.1 Nachweis von Siderophoren

Ionen von Übergangsmetallen (V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo, W) spielen eine bedeutende Rolle im mikrobiellen Stoffwechsel. Etwa 30 % der Proteine eines durchschnittlichen Bakteriums sind Metalloproteine (Vignais et al., 2001). Innerhalb der Zelle tragen sie zur Aufrechterhaltung des osmotischen Drucks bei, während sie als zentraler Bestandteil in Proteinen häufig deren Struktur und Aktivität bedingen.

Eisen ist das Zentralatom von Enzymen, die unentbehrlich für das aerobe Leben sind, da sie zum einen Bestandteil der energieliefernden Elektronentransportvorgänge in der Atmungskette und zum anderen für die Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies („Superoxiddismutase“) verantwortlich sind. Eisen gehört damit zu dem wichtigsten und, aufgrund seiner chemischen Eigenschaften, auch zu dem am schwierigsten aufzunehmenden Spurenelement unter physiologischen Bedingungen. Bei neutralem pH-Wert und Verfügbarkeit von Sauerstoff oxidiert das Fe<sup>2+</sup>-Ion zu Fe<sup>3+</sup>, das in praktisch unlösliche Hydroxide (Eisen(III)-oxidhydrate) übergeht. Dadurch ist die Konzentration an frei

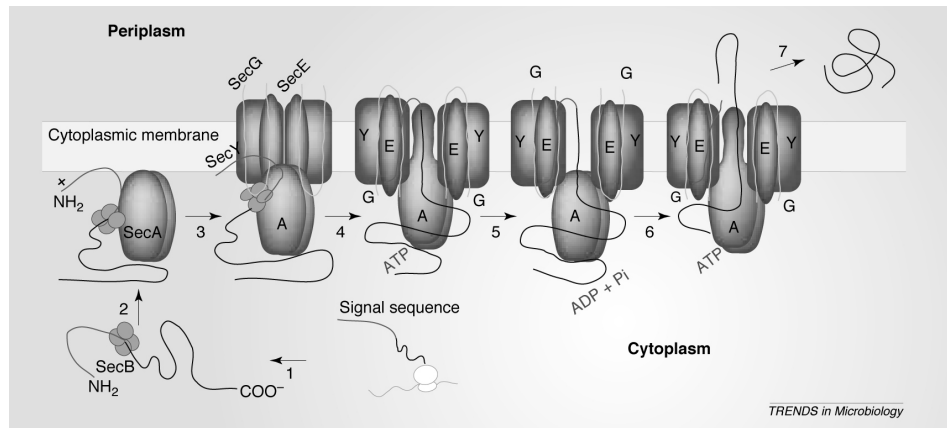
verfügbaren  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen unter aeroben Bedingungen mit  $10^{-18}$  M extrem niedrig (Braun, 2003). Um trotzdem den zellulären Bedarf für die Synthese von Proteinen mit Eisenzentren decken zu können, produzieren Bakterien (und Pilze) Siderophoren, bei denen es sich um Chelatoren mit hohen  $\text{Fe}^{3+}$ -Assoziationskonstanten ( $10^{-23}$ - $10^{-35}$  M) handelt und die eine kontrollierte Aufnahme des Ions ermöglichen. Eine Regulation bei der  $\text{Fe}^{3+}$ -Aufnahme unter aeroben Bedingungen ist trotz der geringen Konzentration notwendig, da redoxaktive Metalle in Nebenreaktionen Sauerstoffradikale bilden, die die Zelle schädigen. Die wichtigsten Reaktionen sind als Fenton- bzw. Haber-Weiss-Reaktion bekannt, bei denen aus Peroxiden und Superoxiden Hydroxylradikale ( $\text{OH}^\cdot$ ) entstehen, die extrem toxisch gegen organische Moleküle wirken (Haber & Weiss, 1932; Fenton, 1876). In allen bekannten *Enterobacteriaceae* liegt die 669 Da große Siderophore Enterobaktin chromosomal codiert vor. Mittels dieser Siderophore können die fakultativ aerob lebenden Bakterienspezies den benötigten Eisen-Co-Faktor für die Synthese der Metalloproteine bereitstellen. Bereits 1979 konnte Williams (Williams et al., 1978) in ersten Versuchen zeigen, dass die Eigenschaft septikämischer *E. coli*-Isolate sich im Blut vermehren zu können offenbar an das Vorhandensein einer weiteren Siderophore, dem Aerobaktin gekoppelt war, dessen Operon i. d. R. auf ColV-Plasmiden codiert vorliegt (Neilands, 1995). Auch im Blut ist der Anteil an frei verfügbaren  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen niedrig ( $10^{-6}$  M), da sie als Zentralion von eukaryotischen Metalloproteinen (Ferritin, Hämosiderin und Häm) intrazellulär fixiert bzw. an hochaffine Glykoproteine des Serums und anderer Körperflüssigkeiten (Transferrin, Lactoferrin u.a.) extrazellulär gebunden werden (Corsa, 1999). Höhere Eisen-Assoziationskonstanten verschiedenster Siderophoren pathogener Bakterien ermöglichen diesen eine Freisetzung des eukaryotisch gebunden Metallions und damit häufig die Etablierung einer Infektion. Die beladenen bakteriellen Chelatoren binden an spezifische Rezeptoren der Zellmembran des Mikroorganismus und werden durch Poren in einem TonB-vermittelten, energieabhängigen Prozess über die äußere Membran in die Bakterienzelle transloziert. Da die Komplexbindungskonstante der Siderophore für  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen sehr viel geringer ist als für dreiwertiges Eisen, wird das Metallion infolge der reduzierenden Eigenschaften des Zytoplasmas nach der Reduktion zu  $\text{Fe}^{2+}$  aus dem Komplex gelöst und kann nachfolgend für den Einbau in bakterieneigene Proteine genutzt werden (Ratledge & Dover, 2000). Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, dass neben dem Aerobaktin-Operon auch die Siderophore Salmochelin häufig auf dem ColV-Plasmid codiert vorliegt (Jeziorowski & Gordon, 2007). Salmochelin galt ursprünglich als charakteristische, chromosomal determinierte Siderophore von *Salmonella enterica ssp. enterica*-Stämmen, die sich offenbar



aufgrund von flankierenden transponierbaren Elementen auch auf ColV-Plasmiden der APEC und in der PAI des uropathogenen *E. coli*-Stammes 536 nachweisen lässt (Hantke et al., 2003; Corsa, 1999). Ebenso verhält es sich mit dem Eisen- und Mangantransportsystem SitABCD, das ebenfalls zuerst bei *Salmonella*-Stämmen nachgewiesen wurde (Ikeda et al., 2005) und ebenfalls auf den sequenzanalysierten ColV-Plasmiden der verschiedenen APEC-Isolate sowie in der PAI I<sub>CFT073</sub> (Welch et al., 2002) und der PAI IV<sub>536</sub> (Schneider et al., 2004) uropathogener Stämme codiert ist (siehe Tab. 2).

### 1.5.2 Nachweis von Adhäsinen

ExPEC besitzen für die Besiedlung der extraintestinalen Bereiche des Wirtes eine Reihe unterschiedlicher fimbrieller und afimbrieller Adhäsine. Drei Gruppen chromosomal determinierter Fimbrien spielen innerhalb des APEC-Pathotyps eine Rolle bei der Anheftung der Bakterien im Respirationstrakt: F1- (Dozois et al., 1995) und P-Fimbrien (Dozois et al., 1992; Dho-Moulin et al., 1990), sowie Curli (Maurer et al., 1998), wobei den F1-Fimbrien bei APEC-Stämmen offenbar die größte Bedeutung zukommt (Dho-Moulin et al., 1990). Eine durch das ColV-Plasmid vermittelte Adhäsion an Wirtsepithelzellen, konnten bisher nur auf einen genetischen Marker zurückgeführt werden. Clancy und Savage (Clancy & Savage, 1981) konnten 1981 durch *in vitro* Adhäsions-Experimente an Maus-Epithelzellen mit einer ColV-Transkonjugante von *E. coli* K-12 ein bis dahin unbekanntes Temperatursensitives Hämagglutinin (Tsh) mit adhäsiven Eigenschaften auf dem Plasmid nachweisen, das mit hoher Prävalenz bei APEC (n = 455; 54,9 %) und in geringerem Umfang bei den humanen ExPEC-Isolaten (UPEC: n = 66; 4,5 %, NMEC: n = 26; 11,5 %) codiert ist (Ewers et al., 2007; Clancy & Savage, 1981). Das Tsh zählt zu den sogenannten „Serin-Protease-Autotransportern“ (SPATEs), die bei den *Enterobacteriaceae* z. B. als Adhäsine, Proteasen, Hämagglutinine, Cytotoxine oder auch Zellinvasionsproteine diverse virulenzassoziierte Funktionen aufweisen (Nataro et al., 1995). Als Autotransporter sind sie in der Lage, ihre eigene Sekretion durch die äußere Membran auf die bakterielle Zelloberfläche hervorzurufen (siehe Abb. 1; Provence & Curtiss, 1994). Zunächst wird in einem Sec-abhängigen Weg das zunächst als 140 kDa große Vorläuferproteine synthetisierte Tsh in das Periplasma geschleust. Nach erfolgter Prozessierung bildet das Tsh mit seiner 33 kDa großen C-terminalen Domäne (Tsh<sub>B</sub>) in der äußeren Membran eine hydrophobe Pore aus, durch die die 106 kDa große Transportdomäne (Tsh<sub>S</sub>) des Proteins auf die Zelloberfläche sezerniert wird (Stathopoulos et al., 1999).



**Abb. 1 Prozessierung von Autotransportern in einem Sec-abhängigen Weg (Pellen, 2004).** Der Transport von Proteinen über die bakterielle Plasmamembran wird durch die sogenannte Sec-Translokase katalysiert. Diese besteht aus den membranintegralen Bestandteilen SecY, SecE, SecG, SecD, SecF und YajC sowie der zentralen Komponente SecA, einer sog. Translokations-ATPase. Das an den Ribosomen synthetisierte Autotransporterprotein (Nr. 1) tritt mit Hilfe des Chaparons SecB aufgrund eines aminoterminal auftretenden Signalpeptids mit SecA in Wechselwirkung (Nr. 2) und aktiviert die Translokase (Nr. 3). Eine ATP-Hydrolyse an SecA in ADP+Pi führt zu dessen Konformitätsänderung und Insertion in die Zytoplasmamembran, wodurch die zu sekretierende Domäne des Autotransporterproteins ins Periplasma geschleust wird (Nr. 4, 5). Die Signalsequenz wird noch während oder kurz nach der Translokation durch eine periplasmatische Signalpeptidase abgespalten und das Autotransporterprotein durch zyklisches binden und spalten von ATP unter Mitwirkung des elektrochemischen Membranpotentials vollständig transloziert (Nr. 6, 7).

Erste Versuche mit der sekretierten Tsh<sub>s</sub>-Domäne ergaben eine Mannose-resistente, temperaturabhängige Hämagglutination von Hühnererythrozyten, solange das Protein mit der bakteriellen Oberfläche verbunden war. Die hämagglutinierende Wirkung führte zu der Vermutung, dass Tsh die bakterielle Adhäsion im Respirationstrakt während der frühen Infektionsphase unterstützt, was in einem *in vivo*-Assay bestätigt werden konnte. Der Infektionsversuch ergab des Weiteren, dass Tsh offenbar bei der Entwicklung von Läsionen und Fibrinablagerungen in den Luftsäcken beteiligt ist und damit hilft, den Infektionsprozess wesentlich zu beschleunigen (Stathopoulos et al., 1999; Dozois, 2000).

Der Sekretionsmechanismus von Tsh<sub>s</sub> auf die bakterielle Oberfläche zeigt große Ähnlichkeit zu den IgA-Proteasen des Serin-Typs, die bei den Spezies *Neisseria gonorrhoeae* und *Haemophilus influenzae* auftreten (Provence & Curtiss, 1994). Trotz des ebenfalls nachgewiesenen Serin-Protease-Motivs „GDSGSPL“ ist Tsh jedoch nicht in der Lage menschliches oder tierisches IgA zu spalten und auch die extrazelluläre Abspaltung von Tsh<sub>s</sub> erfolgt nicht durch die äußere Membranprotease T (OmpT), wie bei den IgA-Proteasen. Trotzdem spricht einiges für eine lytische Aktivität des freigestzten Proteins (Kostakioti & Stathopoulos, 2004). So ergaben Untersuchungen von Dutta und Kollegen (Dutta et al., 2002)

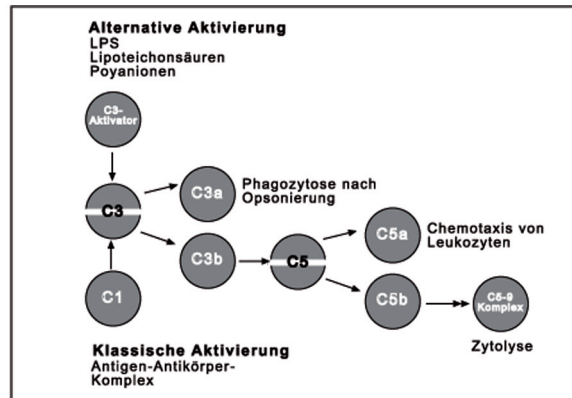
eine proteolytische Wirkung von Tsh<sub>s</sub> auf Schleimhäute und Kostakioti und Stathopoulos (Kostakioti & Stathopoulos, 2004) konnten die Spaltung von Casein durch Tsh<sub>s</sub> nachweisen. Demnach könnte die sekretorische Domäne des Tsh ein bifunktionales Protein sein, das zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Infektionsprozess von Bedeutung ist. Gebunden an die bakterielle Oberfläche fungiert es dabei als Adhäsion, während es freigesetzt in die extrazelluläre Umgebung möglicherweise als Protease eine Bedeutung besitzt (Kostakioti & Stathopoulos, 2004).

### 1.5.3 Serum- (Komplement-) resistenz

Die Serumresistenz vermittelnde Bedeutung von Iss („*increased serum survival protein*“) konnte bereits früh mit dem Nachweis von ColV-Plasmiden in humanen, septikämischen *E. coli*-Isolaten in Zusammenhang gebracht werden (Binns et al., 1982). Die Sequenzanalyse von Iss ergab, dass der offene Leserahmen dieses Proteins (310 bp) in einem 97 bp umspannenden Bereich eine 90 %-ige Homologie zu *bor* (317 bp), einem Gen des Phagen Lambda aufweist. Transformationsversuche mit *E. coli* K-12 bestätigten, dass sowohl Iss als auch Bor den Transformanten jeweils eine deutlich höhere Überlebensfähigkeit in tierischem Serum vermittelten. Demnach bedingt die Sequenzähnlichkeit dieser Proteindomäne speziesübergreifend auch die gleiche Funktion in Bakterien und Phagen. Phylogenetische Untersuchungen lassen den Rückschluss zu, dass *iss* ursprünglich Teil der Lambda- oder einer verwandten Phagen-DNS war, die durch Rekombinationsereignisse auf ein ColV-Plasmid übertragen wurde (Barondess & Beckwith, 1995; Chuba et al., 1989).

Der genaue Mechanismus der Resistenzvermittlung durch Bor/Iss ist nicht bekannt. Vermutlich verändern die Proteine enzymatisch äußere Komponenten der Membran und schützen sie so vor dem Erkennen durch das Komplementsystem, der unspezifischen Immunabwehr der Wirbeltiere (Binns et al., 1982). Sechszwanzig Proteine werden im Komplementsystem kaskadenartig entweder, über den klassischen Weg der Antigen-Antikörpererkennung oder über einen alternativen Weg, durch mikrobiologische Abbauprodukte (LPS, LTA und Polyanionen) aktiviert und bewirken so die Ausbildung des biologisch wirksamen Komplementfaktorkomplexes (C5-C9; siehe Abb. 2). Mehrere Effektormechanismen dieses Komplementkomplexes (Chemotaxis, Opsonierung, Immunadhärenz, Freisetzung von Entzündungsmediatoren, Membranschädigungen und Zytolyse) führen letztendlich zu einer vollständigen Beseitigung der Erreger. Binns und Kollegen (Binns et al., 1982) konnten zeigen, dass Iss die Zusammensetzung des C5b-9-

Komplexes nicht verhindert, sondern offenbar erst nach dessen Ausbildung eine protektive Bedeutung für das Bakterium besitzt.



**Abb. 2 Klassische und alternative Aktivierung des Komplementfaktorkomplexes des Immunsystems (Madigan et al., 2001).** Die einzelnen Pro-Enzyme des Komplementsystems werden in einer festgelegten Reihenfolge durch Spaltung aktiviert. Bei dem klassischen Reaktionsweg führt die proteolytische Aktivität von C3 über die aktivierten Komponenten C1, C4 und C2, die bei dem Alternativweg umgangen werden. Hier kommt es direkt zur Aktivierung der wichtigen C3-Komponente mit anschließender Spaltung in C3a und C3b. Über C3b läuft der Aktivierungsprozess von C5 und dessen Fraktionierung in C5a und C5b weiter, wobei C5b mit C6, 7, 8 und 9 aggregierte Komplexe mit hoher Membranaffinität ausbildet. Der C5-9-Komplex führt zu Membranschädigungen an den Zellwänden, die je nach Zelltyp zur Bakteriolyse, Zytolyse oder Hämolyse führen.

Neben Iss befindet sich auf konjugativen ColV-Plasmiden auch das Gen des 26 kDa großen Proteins TraT. *traT* ist Teil des Transferoperons von konjugativen Plasmiden, wird aber unabhängig von dem Plasmidtransfer exprimiert (Achtman et al., 1980). Offenbar blockiert TraT ähnlich dem Iss die Funktion des letzten Komplementfaktorkomplexes, nicht aber seine Ausbildung und verhindert darüber ebenfalls die effiziente Wahrnehmung der Bakterien durch die phagozytierenden Zellen (Binns et al., 1982).

## 1.6 Aufgabenstellung

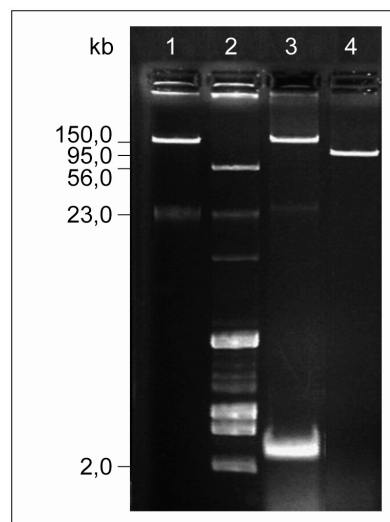
Die vorliegende Arbeit wurde an dem APEC-Stamm IMT5155 durchgeführt, der ursprünglich aus einem an Colibakteriose erkrankten und verendeten Huhn isoliert worden war. Er gehört zur Serogruppe O2:K1:H5 und wurde im Zuge einer Doktorarbeit neben 149 *E. coli*-Isolaten, von ebenfalls erkrankten und verendeten Hühnern unterschiedlichen Alters, genotypisch charakterisiert (Janßen et al., 2001). Bei der genotypischen Charakterisierung von IMT5155 wurden neben den chromosomal gelegenen Genen des äußeren Membranproteins A (*ompA*), der K1-Kapsel (*kpsI*), der Proteinen des Eisenmetabolismus (*chuA*, *irp2*, *fyuA*, *ireA*), der Typ1-Fimbrie (*fimC*) und Curli (*csgA*) auch die virulenzassoziierten Gene des Aerobaktin- (*iucABCD*; *iutA*), Salmochelin- (*iroBCDEN*) und Sit-Operons (*sitABCD*), die der Serumresistenz vermittelnden Proteine TraT (*traT*) und Iss (*iss*), des Temperatursensitiven Hämagglutinins (*tsh*) und des Colicin V-Operons (*cvaABCD*; *cvi*) nachgewiesen, die das Auftreten eines ColV-Plasmids in dem APEC-Stamm wahrscheinlich machten (Ewers et al., 2004). Ziel dieser Arbeit war es, ein Plasmidprofil von IMT5155 zu erstellen, sowie die identifizierten Plasmide zu isolieren und so weit wie möglich zu charakterisieren. Hiefür mussten zunächst Teilsequenzen der Plasmid-DNS in der Cosmid-Genbank von IMT5155 nachgewiesen werden, um diese zur Erstellung einer Plasmidkarte sequenzanalysieren zu lassen. Zum besseren Verständnis der Bedeutung des Colicin V codierenden Plasmids für die Pathophysiologie des APEC-Stammes IMT5155 sollten zudem phänotypische Charakterisierungen des Plasmids erfolgen, die neben Erkenntnissen über seine Stabilität, Serumresistenz und sein Konjugationsverhalten auch verschiedene *in vivo* und *in vitro* Versuche zu den bereits beschriebenen virulenzassoziierten Eigenschaften umfassen sollten. Als mikrobieller Modellorganismus sind die meisten der in *E. coli* auftretenden Metallhomöostase-Mechanismen bekannt. Im Vergleich zu den apathogenen Laborstämmen ist die hohe Redundanz der eisenakquirierenden Systeme bei IMT5155 und anderen untersuchten APEC- und ExPEC-Isolaten auffällig, was Rückschlüsse auf eine wesentliche Bedeutung für die Pathogruppe zulässt. Inwiefern das Vorhandensein von Eisenionen regulatorischen Einfluss auch auf weitere, als virulenzassoziiert geltende Gene des ColV-Plasmids nimmt, sollte anhand von *iss* und *tsh* untersucht werden. Zu diesem Zweck mussten die Promotoren beider Gene zunächst identifiziert und jeweils in einen  $\beta$ -Galaktosidase-Expressionsvektor ligiert werden, die nachfolgend für die Untersuchungen der Promotoraktivitäten unter verschiedenen Wachstumsbedingungen eingesetzt werden sollten.

## 2 Ergebnisse

### 2.1 Plasmid-Isolierungen

#### 2.1.1 Plasmid-Isolierung zur Erstellung eines Plasmidprofils von IMT5155

Aviäre pathogene *E. coli* (APEC)-Stämme sind häufig Träger mehrerer hochmolekularer Plasmide mit genetischen Informationen von Colizinen und Antiinfektiva (Johnson et al., 2006b). Um die Anzahl vorhandener Plasmide des APEC-Stammes IMT5155 (O2:K1:H5) bestimmen zu können, wurde eine modifizierte Kado-Lyse (Kado & Liu, 1981) durchgeführt, bei der keine Aufreinigung der Plasmid-DNS durch Ethanolwaschschritte stattfand. Die Größe der nativen Plasmide konnte mit Hilfe bereits charakterisierter Referenzplasmide aus *E. coli*- und *Salmonella*-Stämmen bestimmt werden (Bauerfeind et al., 1992; Hughes & Datta, 1983). Auf diese Art und Weise ließen sich bei IMT5155 zwei Plasmide, ein hochmolekulares ~160 kb (p1ColV<sub>5155</sub>) und ein niedermolekulares um die 5 kb großes Plasmid (p2<sub>5155</sub>), nachweisen (siehe Abb. 3).



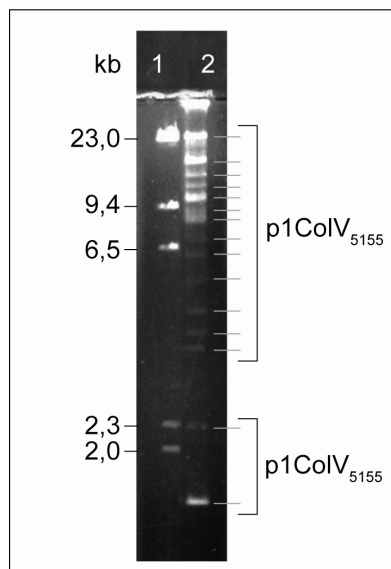
**Abb. 3 Elektropherogramm des nativen Plasmidprofils von IMT5155 im Vergleich zu Referenzplasmiden verschiedener *Enterobacteriaceae*.** Entsprechend der modifizierten Methode von Kado und Liu (Kado & Liu, 1981) wurden jeweils 1,5 ml Bakteriensuspension lysiert, die Proteine gefällt und der Überstand mit  $\frac{1}{10}$  Stopplösung versehen in einem 0,8 %-igen TAE-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Plasmidbanden wurden durch ein nachfolgendes Ethidiumbromidbad sichtbar gemacht, um zu gewährleisten, dass die hochmolekularen Plasmide durch ausreichend interkalierenden Farbstoff erkennbar werden. Auf Höhe der 23-kb-Bande sind Reste nicht abgebauter chromosomaler DNS erkennbar.

1- *E. coli* R55 (~ 150 kb), 2- *E. coli* V517 (2-56 kb), 3- IMT5155, 4- *S. enterica enterica* Typhimurium (95 kb)

Bei dem hochmolekularen Plasmid handelte es sich um ein Colicin V-Plasmid, da einige der ColV-typischen virulenzassoziierten Gene bereits vor Beginn dieser Arbeit mittels PCR in molekularepidemiologischen Untersuchungen von APEC-Isolaten nachgewiesen worden waren (Janßen et al., 2001).

### 2.1.2 Plasmid-Isolierung für analytische Zwecke

Die Plasmid-Isolierung aus dem APEC-Stamm IMT5155 erfolgte über die Megaplasmid-Isolierung nach Nies (Nies et al., 1987). Diese Methode basiert, wie alle Methoden zur Plasmidisolierung, auf der alkalischen Lyse (Birnboim & Doly, 1979), weist jedoch spezielle Handhabungs- und Reinigungsschritte auf, die das Scheren großer Plasmide herabsetzen und damit weiterführende Untersuchungen am nativen Plasmid ermöglicht. Die erfolgreiche Isolierung des nativen Plasmids wurde nachfolgend mit dem Enzym *EcoRI* überprüft. Die gelelektrophoretische Auftrennung der restringierten IMT5155-Plasmide ergab insgesamt 15 Fragmente (siehe Abb. 4). Die Größen der Fragmente wurden zum überwiegenden Teil rechnerisch bestimmt und ließen eine Gesamtgröße des Plasmids p1ColV<sub>5155</sub> von 131,7 kb vermuten. Die, auf Basis des Gelbildes berechnete Größe ist recht ungenau, da die Breite der nachgewiesenen Banden zum Teil das Auftreten von mehreren Fragmenten pro Bande vermuten lassen.



**Abb. 4 Elektropherogramm der *EcoRI*-Restriktion von p1ColV<sub>5155</sub> und p2<sub>5155</sub>.** Standardmäßig wurden 5  $\mu$ l der isolierten Plasmid-DNS über Nacht mit 2,5 Units *EcoRI*-Enzym restringiert und der vollständige Ansatz (20  $\mu$ l) nach Zugabe von Stopplösung elektrophoretisch in einem 0,8 %-igen Agarosegel über Nacht aufgetrennt. Die Färbung der Plasmidbanden erfolgte nachträglich im Ethidiumbromidbad.

1-  $\lambda$ -HindIII-Marker, 2- Restriktionsprofil der Plasmide p1ColV<sub>5155</sub> und p2<sub>5155</sub> von IMT5155

## 2.2 Sequenzanalytische Untersuchung von p1ColV<sub>5155</sub>

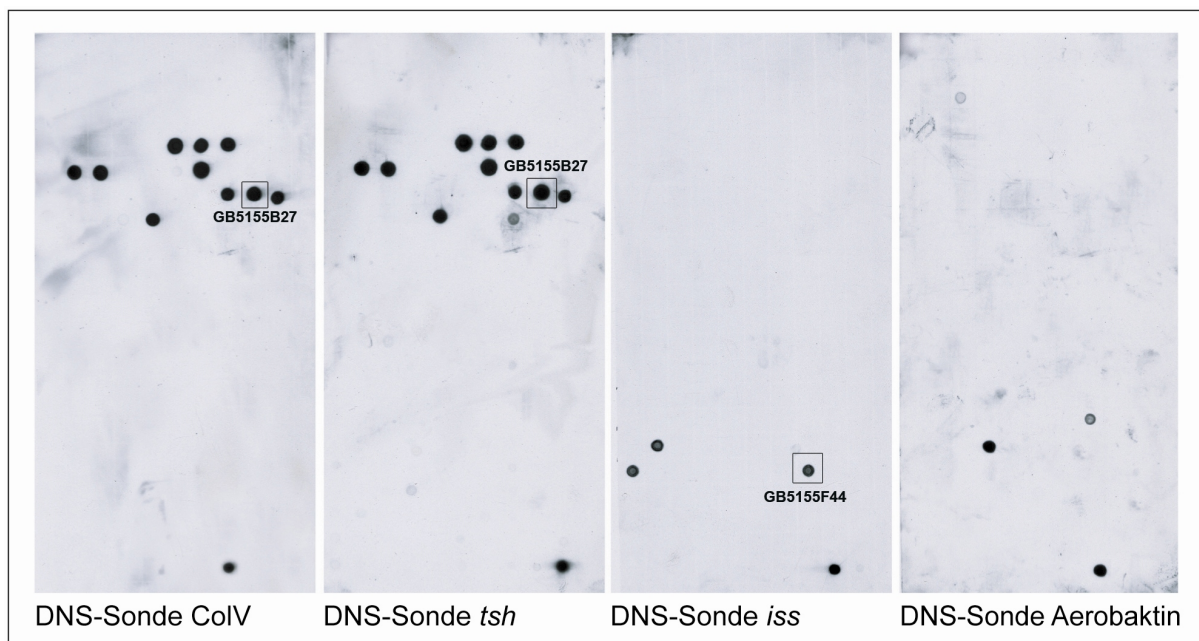
### 2.2.1 Nachweis von p1ColV<sub>5155</sub>-Sequenzen in der Gen-Bibliothek von IMT5155

Sequenzanalysen von großen Plasmiden erfolgen in der Regel ausgehend von Bibliotheken mit „shotgun“ klonierter Plasmid-DNS. Abhängig von der Größe des zu untersuchenden Plasmids wird eine überschüssige Anzahl an Transformanten auf die Insertion von Plasmid-DNS hin überprüft und dann in 6-8 Sequenzierläufen analysiert. Die Auswertung der Läufe gibt Auskunft über die Lücken in der Sequenzabfolge, die i. d. R. durch überlappende PCRs geschlossen werden können. Da diese Methode für ein etwa 160 kb großes Plasmid zu dieser Zeit immernoch recht kostenintensiv war, sollte die genotypische Charakterisierung von p1ColV<sub>5155</sub> über die Sequenzanalyse von Cosmidklonen erfolgen.

Vor Beginn dieser Arbeit konnte durch genotypische Analysen der Nachweis des Colicin V-Operons (*cvi*, *cvaABC*), der Siderophore Aerobaktin (*iutA*, *iucABCD*), des Komplement-resistenz vermittelnden Proteins Iss (*iss*) und des Temperatursensitiven Hämagglutinins (*tsh*) erfolgen, die als genetische Marker für den Nachweis von ColV-Plasmiden septikämischer ExPEC-Isolate gelten. Um diese Loci innerhalb der Cosmid-Bibliothek des Gesamtgenoms von IMT5155 wiederfinden zu können, wurde für jeden plasmidgenetischen Marker eine Dig-markierte DNS-Sonde mittels PCR hergestellt. Für das ColV-Operon wurde ein Gen-übergreifendes Primerpaar ausgewählt, deren 598 bp großes Amplifikat einen Teil des ColV-Immunitätsproteins sowie der Colicin-Synthase (*cviS/cvaS*) umfasste. Die Gensonde zum Nachweis des Aerobaktin-Operons hybridisierte mit 710 bp im Gen *iucD* (Primer: *iucD.fp/iucD.rp*) des Operons, während die DNS-Sonde von *iss* das gesamte Gen (309 bp; Primer: *iss cdsfw/iss cdsrv*) als Template nutzte. Innerhalb des 4.143 bp großen *tsh* wurde im 5'-codierenden Bereich eine 823 bp große DNS-Sonde generiert (Primer: *tsh.FP<sub>(132)</sub>/tshRP<sub>(955)</sub>*). Als Grundlage für die Auswahl der Primerpaare dienten Sequenzeinträge verschiedener ColV-Plasmide. Für Colicin V und *tsh* wurde pAPEC-1 [Acc. AF23873], für Aerobaktin pColV-K30 [Acc. AJ223631] und für *iss* pAPEC-O2 [Acc. AAD41540] genutzt. Die DNS von insgesamt 680 Cosmidklonen des APEC-Stammes IMT5155 wurden im Dot-Blot-Verfahren auf eine Nylonmembran aufgebracht und anschließend mit den verschiedenen DNS-Sonden hybridisiert. Von den 680 Cosmidklonen zeigten weitgehend identische Klone ein positives, durch DNS-DNS-Hybridisierungen initiiertes Signal mit DNS-Sonden zum spezifischen Nachweis des ColV-Operons und von Tsh, während Iss und das Aerobaktin-Operon positive Signale bei jeweils anderen Cosmidklonen aufzeigten (siehe Abb. 5). Mit einem positiven Klon für *tsh* und das Colicin V-Operon (GB5155B27), einem für *iss* (GB5155F44) und einem für das Aerobaktin-Operon



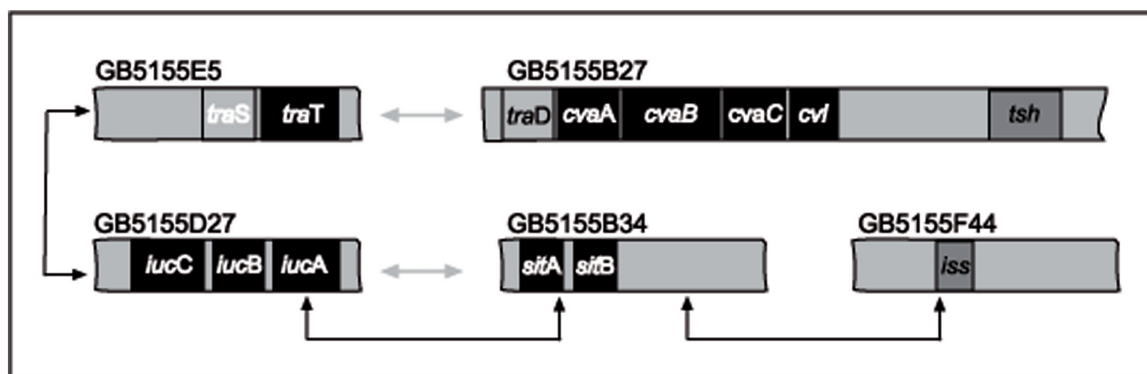
(GB5155D27) lagen etwa 90 kb der Plasmid-DNS in drei verschiedenen Cosmiden verpackt vor, da die Aufnahmefähigkeit des für die Gen-Bibliothek genutzten *SuperCosI*-Vektors bei etwa 30 kb Fremd-DNS liegt. Da p1ColV<sub>5155</sub> der Restriktionsanalyse zur Folge über 128,5 kb groß sein musste, wurde die 5'-flankierende Region des Cosmidklons GB5155B27 sequenzanalysiert, um weitere Gene für die Entwicklung einer DNS-Sonde ausfindig zu machen. Die Analyse ergab eine Übereinstimmung der flankierenden Sequenz zu dem Gen *traD* der Transfer (*tra*)-Region des konjugativen F-Plasmids [Acc. AP001918]. Da sich im *tra*-Operon stromaufwärts von *traD* das Gen für TraT befindet, wurden die Cosmide der Gen-Bibliothek mit einer DNS-Sonde für *traT* gescreent (Primer: traT.FP/traT.RP; 429 bp). Mit GB5155E5 konnte ein Klon identifiziert werden, der offenbar nicht nur die genetische Information für TraT, sondern auch für das ColV-Operon codiert, während die DNS-DNS-Hybridisierungen mit DNS-Sonden zum Nachweis von *tsh*, *iss* und *iucD* kein Signal zur Folge hatten.



**Abb. 5 Autoluminogramme der DNS-DNS-Hybridisierungen mit verschiedenen pColV-spezifischen DNS-Sonden und der Cosmid-Genbibliothek von IMT5155.**

Die Autoluminogramme zeigen Übereinstimmungen und Unterschiede von DNS-DNS-Hybridisierungsergebnissen 459 überprüfter Cosmidklone mit spezifischen DNS-Sonden für das Colicin V- und Aerobaktin-Operon, Tsh und Iss. Der Cosmidklon GB5155B27 codiert sowohl für das Colicin V-Operon als auch Tsh. GB5155F44 wurde aufgrund der positiven DNS-DNS-Hybridisierung mit *iss* für weitere Untersuchungen ausgewählt und der Cosmidklon GB5155D27 (hier nicht abgebildet) für Untersuchungen des Aerobaktin-Operons. Die hier abgebildeten Autoluminogramme der verschiedenen DNS-DNS-Hybridisierungen stammen von einer Membran, auf der sich die DNS der Cosmidklone sowie der PCR-Amplifikate (Positivkontrollen; jeweils unten rechts im Bild) befanden.

Ein letzter Cosmidklon konnte durch ein positives Signal mit einer DNS-Sonde zum Nachweis des Mangan-/Eisentransporters SitABCD (*sitABCD*) aufgezeigt werden. Als genetische Grundlage für die Auswahl des letzten Primerpaares wurde das periplasmatische Bindeprotein (*sitD*; Primer: *sitD*.fp/*sitD*.rp; 639bp) von pAPEC-1 [Acc. AY598030] genutzt. Es konnte mit GB5155D34 ein Cosmidklon ausgewählt werden, der ebenfalls die genetische Information des Aerobaktin-Operons aufwies, was auf eine relative Nähe der beiden Loci hindeutete. Die DNS-DNS-Hybridisierungsergebnisse lassen jedoch keinen eindeutigen Rückschluß auf die Sequenzabfolge der nachgewiesenen Cosmidklone im nativen Plasmid zu, da die intergenomischen Abstände der gescreenten Loci von nicht einzuschätzender Größe waren. Sequenzanalytische Ergebnisse von p1ColV5155 konnten zu einem späteren Zeitpunkt dieser Arbeit zeigen (siehe Abschnitt 2.2), dass sich das Gen von *Iss* in relativer Nähe zur Siderophore Salmochelin (*iroBCDEN* [Acc. AF449498]) befindet, obwohl durch die DNS-DNS-Hybridisierungen kein überlappender Klon gefunden werden konnte (siehe Abb. 6). Zu begründen ist dies mit einem über 40 kb große Sequenzabstand der beiden Genbereiche, der außerhalb der Verpackungseinheit des SuperCos1-Vektors lag.



**Abb. 6 Schematische Darstellung flankierender Cosmidklone der Genbank von IMT5155**  
Die grauen Pfeile weisen auf Cosmidklone hin, die entsprechend den Ergebnissen der DNS-DNS-Hybridisierungen mit der Gen-Bibliothek von IMT5155 und p1ColV5155-spezifischen DNS-Sonden benachbart sein sollten, während die schwarzen Pfeile die Abfolge der Cosmidklone im nativen Plasmid, entsprechend der später durchgeführten Sequenzanalyse, zeigen. Der Analyse zur Folge konnte die Überlappung von GB5155D27 mit GB5155D34 bestätigt und von GB5155D34 mit GB5155F44 aufgezeigt werden. Entgegen den DNS-DNS-Hybridisierungsergebnissen liegt die Sequenz von GB5155E5 allerdings benachbart zu der des Cosmidklons GB5155D27 und nicht zu GB5155B27.

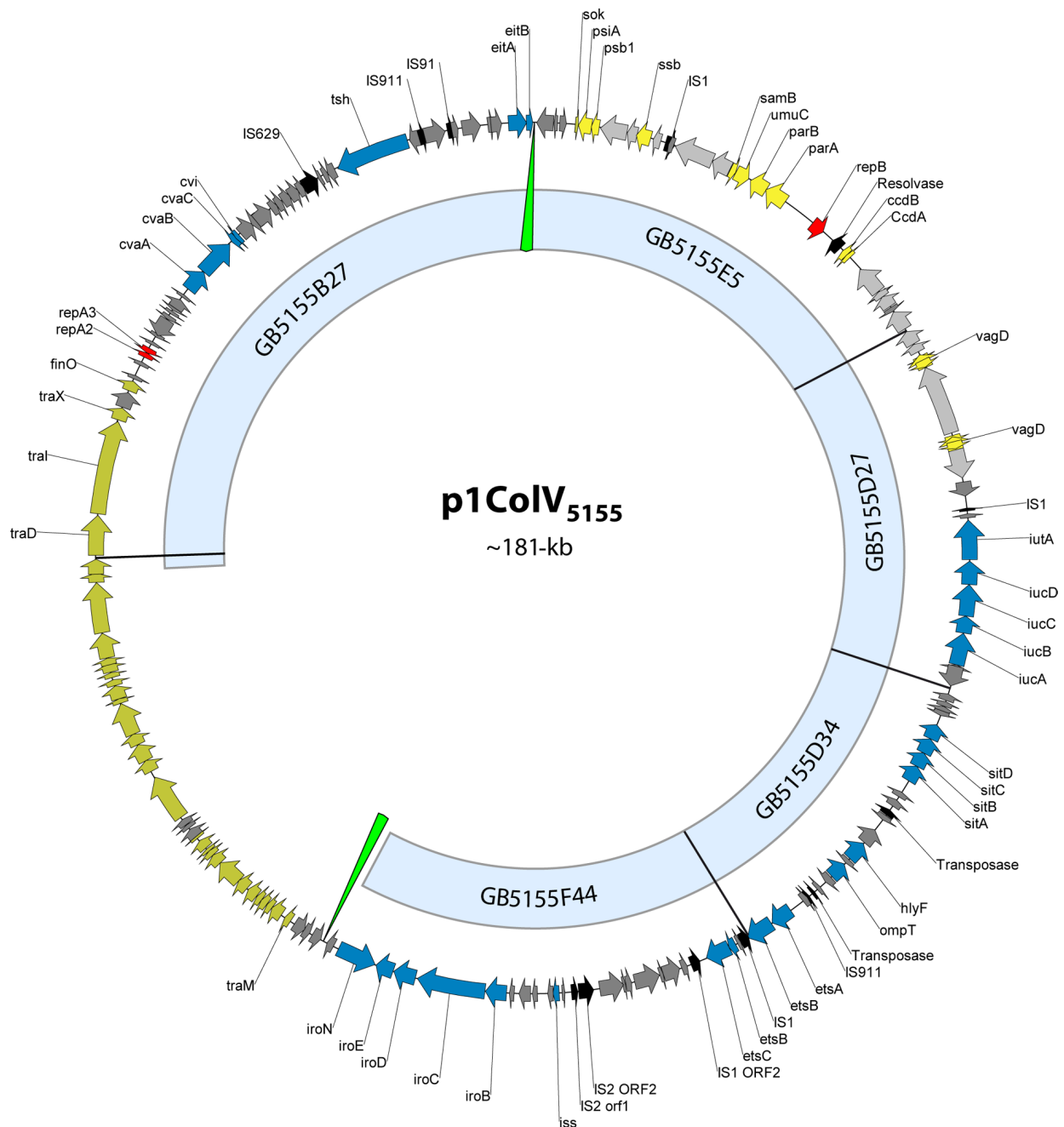
Für weiterführende Untersuchungen und Sequenzanalysen wurde die rekombinante DNS der einzelnen Cosmide in RFLP-Analysen auf ihre Kolinearität überprüft. Dafür erfolgte eine Restriktion der Cosmide und des Wildtyp-Stammes IMT5155 mit zwei verschiedenen Restriktions-Endonukleasen. Der Ansatz wurde anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt und geblottet. Durch DNS-DNS-Hybridisierungen mit den Dig-gelabelten Fragmenten des

jeweiligen restringierten Cosmids konnten entsprechende, kolineare Fragmente im Wildtyp-Stamm IMT5155 nachgewiesen werden. Alle identifizierten Cosmide waren kolinear zur Gesamt-DNS von IMT5155 und konnten für weitere Untersuchungen genutzt werden.

### 2.2.2 Sequenzvergleich bekannter Colicin-codierender Plasmide mit p1ColV<sub>5155</sub>

Für die Auswertung der Ergebnisse dieser Arbeit lagen, neben einer Reihe von Teilsequenzinformationen, die vollständigen Sequenzanalysen von zwei hochmolekularen Colicin codierenden APEC-Plasmiden vor. Aus einem APEC O2:K2-Stamm, der aus einem Huhn mit dem Krankheitsbild der Colibakteriose isoliert worden war, konnte das 180 kb große ColV-Plasmid pAPEC-O2-ColV [Acc. NC\_007675] isoliert und vollständig sequenzanalysiert werden (Chlosta et al., 2006). Mit dem 174 kb großen pAPEC-O1-ColBM [Acc. DQ381420] erfolgte die Sequenzanalyse eines weiteren Colicin produzierenden Plasmids, das aus einem APEC-O1-Stamm (O1:K1) [Acc. NC\_008563] isoliert worden war und mit B und M andere Colicine exprimiert als pAPEC-O2 (Johnson et al., 2006b). Der Vergleich von pAPEC-O1-ColBM [Acc. DQ381420] mit pAPEC-O2-ColV [Acc. NC\_007675] hatte eine Übereinstimmung der *orfs* von 67 % ergeben (die IS-Elemente waren davon ausgenommen). Die Ähnlichkeit umfasst im Wesentlichen die Replikationsursprünge (RepFIB und RepFIIA) und eine nahezu identische Transferregion (*tra*-Operon), die jeweils zum Kerngenom konjugativer Plasmide gehören (Johnson et al., 2006b). PCR-geführte Untersuchungen an 594 APEC-Isolaten, die aus dem septikämischen Krankheitsgeschehen bei Geflügel in den Vereinigten Staaten stammten, hatten die Ausdehnung des Kerngenoms ColV codierender Plasmide um ein putatives 93 kb großes Virulenzcluster (siehe Abschnitt 2.2.3) zur Folge, das mit 59 % in den APEC-Stämmen nachgewiesen werden konnte. Dieses Gencluster tritt offenbar nicht nur bei ColV-Plasmiden auf, sondern konnte ebenfalls bei dem ColBM-Plasmid nachgewiesen werden (Johnson et al., 2005b). Unterschiede zwischen dem pAPEC-O1-ColBM [Acc. DQ381420] und pAPEC-O2-ColV [Acc. NC\_007675], aber auch innerhalb der Gruppe der ColV-Plasmide (26 % Übereinstimmung bei den 595 untersuchten APEC-Stämmen) traten bevorzugt in einer variablen Region auf, die am 3'-Ende des *cvaB*-Gen des ColV-Operons beginnt und sich durch eine hohe Variabilität der nachfolgenden Gene in Art und Anzahl auszeichnet. Offenbar befindet sich innerhalb des Colicin V-Operons eine Art „Hot spot“ für die Insertion fremder DNS (Johnson et al., 2005b; Johnson et al., 2006b). Von p1ColV<sub>5155</sub> wurde die DNS der fünf identifizierten Cosmidklonen durch die Firma LGC Genomics GmbH) sequenzanalysiert. Durch Erstellung subklonaler Genbanken und einer fortlaufenden

Primersynthese-Sequenzierreaktion („Primerwalking“) konnten 151 kb der Plasmidsequenz entschlüsselt werden (siehe Abb. 7). Demnach konnten 141 *orfs* analysiert werden, von denen 25 (17,7 %) Ähnlichkeit zu IS-Elementen und Transposasen, 44 (31,2 %) zu virulenzassoziierten Genen und 72 (51,1 %) zu *orfs* aufwiesen, die offenbar in Proteine unbekannter Funktion translatiert werden. Davon lassen sich 46 (63,9 %) als hypothetische Proteine klassifizieren, die keine Übereinstimmung zu bekannten Proteinen der Datenbanken aufweisen und 26 (36,1 %) als konserviert hypothetische Proteine, die mit Proteinen unbekannter Funktion übereinstimmen (siehe Anhang, Tab. 14). Vergleicht man die Gesamtsequenzen von pAPEC-O2-ColV [Acc. NC\_007675], pAPEC-O1-ColBM [Acc. DQ381420] und p1ColV<sub>5155</sub> (Teilsequenzen) miteinander wird deutlich, dass die Ähnlichkeit der beiden ColV-Plasmide zueinander größer ist, da sie neben dem Colicin V auch transponierbare Sequenzbereiche (IS-Elemente, Transposasen, Integrasen, Resolvasen) umfassen, die bei pAPEC-O1-ColBM [Acc. DQ381420] nicht nachzuweisen sind (Chlosta et al., 2006; Johnson et al., 2006b).



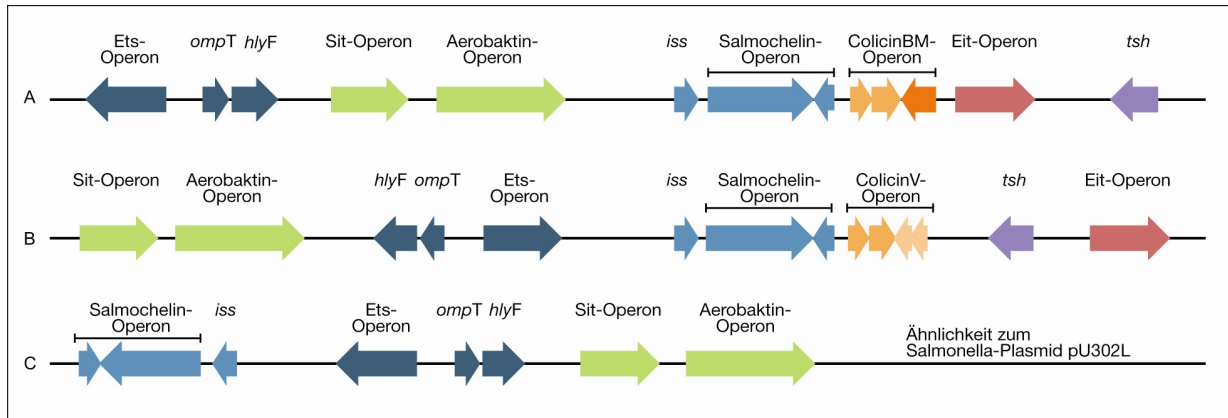
**Abb. 7 Zirkuläre Darstellung der ermittelten Genabfolge des Plasmids p1ColV<sub>5155</sub>.**

Der Nachweis offener Leserahmen mit einer Mindestgröße von 150 NS und deren Assemblierung erfolgte mit Hilfe der Programme DNASTAR (LaserGene, USA) und Kodon (Applied Maths BVMA, USA). Die Orientierung, der als Pfeile gezeichneten *orfs* gibt ihre Transkriptionsrichtung wieder. Pfeile mit blauer Färbung markieren virulenzassoziierte Gene, gelbe Pfeile markieren *orfs*, die an einer stabilen Plasmidweitergabe, und rote Pfeile *orfs*, die an der Replikation des Plasmids beteiligt sind. Okka sind die *orfs* des *tra*-Operons dargestellt, deren Abfolge nicht sequenzanalytisch von p1Col<sub>5155</sub> ermittelt, sondern entsprechend der Sequenz von pAPEC-O2-ColV [Acc. NC\_007675] übernommen worden ist. Schwarze Pfeile kennzeichnen mobile genetische Elemente und graue Pfeile *orfs* mit unbekannter Funktion. Die langen hellgrünen Pfeile kennzeichnen die Abschnitte, bei denen Sequenzinformationen unbekannter Länge fehlen. Der innere hellblaue Kreis zeigt an, auf welchen Cosmidklonen der Genbank die *orfs* nachgewiesen werden konnten.

### 2.2.3 Konservierte Virulenzgencluster

Die Gene einer Reihe von Proteinen, die bereits früh als ColV-spezifisch erkannt wurden (Waters & Crosa, 1991) und z. T. in Tab. 1 als ExPEC-spezifisch gelten, lassen sich auch auf p1ColV<sub>5155</sub> nachweisen. Hierzu gehören neben denen des namensgebenden Colicin V-Operons (*cvi*; *cvaABC*), die der Komplementresistenz (*iss*, *traT*), des Temperatursensitiven Hämagglutinins (*tsh*), sowie die Gene der Siderophore Aerobaktin (*iucABCD*; *iutA*) (Waters & Crosa, 1991). Auch die auf pAPEC-O2-ColV [Acc. NC\_007675] und pAPEC-O1-ColBM [Acc. DQ381420] zusätzlich auftretenden ABC-Transportsysteme von Übergangsmetallen, Sit (*sitABCD*; [Acc. AY598030]) und Salmochelin (*iroBCDEN* [Acc. AF449498]) konnten auf p1ColV<sub>5155</sub> nachgewiesen werden (Chlosta et al., 2006; Johnson et al., 2006b). Von den Genen des putativen Eisentransportsystems EitABCD des pflanzenpathogenen Stammes *Pseudomonas syringae* kommt *eitAB* ebenfalls auf p1ColV<sub>5155</sub> vor. Die Gene *eitCD* befinden sich offenbar auf einem DNS-Abschnitt, der die Cosmide GB5155B27 und GB5155E5 sequenzanalytisch verbindet, indem sich aber eine oder mehrere *SauIIIA*-Schnittstellen befinden könnten. Ein putatives ABC-Transportsystem von *Shewanella oneidensis* (EtsABC) liegt ebenfalls auf p1ColV<sub>5155</sub> codiert vor. Allerdings ist in dem Operon das Gen für die zytoplasmatische Membranpermease (EitB) durch die Insertion einer *IS1*-Sequenz unterbrochen. Inwiefern die Insertion Auswirkungen auf die Funktionalität des ABC-Transporters hat ist fraglich. Die Gene von ShiF und ShiG, die in der PAI<sub>SHI-II</sub> des namensgebenden Bakteriums *Shigella flexneri* nachgewiesen wurden, liegen ebenfalls unvollständig, das des aviären Hämolytins (HlyF) vollständig auf dem pColV-Plasmid von IMT5155 vor.

Mit Ausnahme der Gene des Colicin V-Operons, des Tsh und des Eit-Operons, die eine variable Region charakterisieren, befinden sich die oben genannten Operons und Gene bei pAPEC-O2-ColV [Acc. NC\_007675] und pAPEC-O1-ColBM [Acc. DQ381420] in der als konserviert angenommenen virulenzassoziierten Kernregion von Colicin-codierenden Plasmiden (Johnson et al., 2005b). Trotz großer genetischer Übereinstimmungen beider Plasmide innerhalb der Virulenzcluster unterscheiden diese sich durch die Inversion und Relokation eines Genblocks, der *etsABC*, *ompT*, *hlyF*, die Gene des Sit- bis hin zum 3'-Ende des Aerobaktin-Operons umfasst. Diese Gene konnten auch bei p1ColV<sub>5155</sub> sequenzanalytisch nachgewiesen werden, allerdings in einer nochmals veränderten Orientierung und Anordnung. Kolinearitätsuntersuchungen und Sequenzüberlappungen der analysierten Cosmide bestätigen, dass bei p1ColV<sub>5155</sub> offenbar der Sequenzabschnitt vom 5'-Ende des *hlyF*-Gens bis hin zum 3'-Ende des Salmochelin-Operons invers orientiert vor dem Sit-Operon und dem

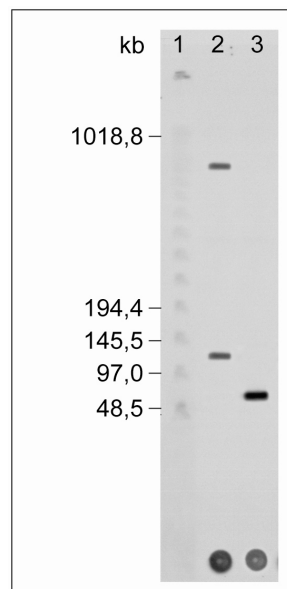


#### 2.2.4 Lokalisation und Kopienzahl der *sit*- und *iro*-Genkluster

Einige plasmidcodierte virulenzassoziierte Faktoren, die mit dem ExPEC-Pathotyp assoziiert sind (siehe Tab. 1), treten aufgrund ihrer Lokalisation auf MGEs in bakteriellen Genomen z. T. mit mehreren Kopien auf. Der Rezeptor der Siderophore Salmochelin (IroN) konnte mit zwei Kopien im Genom des uropathogenen *E. coli*-Stammes HE300 nachgewiesen werden (Sorsa et al., 2003), ebenso wie das ABC-Transportsystem Sit im APEC  $\chi$ 7122 (Sabri et al., 2006). Das Transportsystem liegt in den Genomen der ExPEC-Stämme offenbar chromosomal und/oder plasmidcodiert vor (Rodriguez-Siek et al., 2005; Schouler et al., 2004; Welch et al., 2002), ähnlich den Genen des Temperatursensitiven Hämagglutinins (Tsh) und des Serumresistenz vermittelnden Proteins Iss. Sowohl *iss* als auch *tsh* sind bei APEC-Isolaten i. d. R. auf ColV-Plasmiden lokalisiert, obwohl beide auch im Chromosom nachgewiesen werden konnten (Dozois *et al.*, 2000; Waters & Crosa, 1986; Waters & Crosa,



1988; Wooley, 1992). Lokalisation und Häufigkeit des Operons von Salmochelin und SitABCD, sowie der Gene *iss* und *tsh* wurden auch für IMT5155 bestimmt. Der APEC-Stamm wurde nach Endonuklease-Restriktion in einer Pulsfeldgelelektrophorese aufgetrennt und die DNS anschließend auf einer Nylonmembran mittels Southern Blot fixiert. Für die DNS-DNS-Hybridisierungen wurden dieselben Oligonukleotid-Sonden genutzt, mit denen die Genbank von IMT5155 auf Plasmidsequenzen gescreent wurde (siehe Abschnitt 2.2.1). Die DNS-Sonde, die zum Nachweis des Salmochelin-Operons (Primer: *iroE.fw/iroE.rp*; 195 bp) eingesetzt wurde, ergab ein positives Hybridisierungssignal auf einem ~ 48,5 kb großen DNS-Fragment (siehe Abb. 9). Die DNS-Sonde für den Sit-Lokus (Primer: *sitD.fp/sitD.rp*; 639 bp) hybridisierte hingegen mit zwei DNS-Fragmenten von IMT5155 (siehe Abb. 9). Ein positives Signal trat mit einem ~110 kb großen Genomfragment auf, womit es sich hierbei wohl um eine plasmidcodierte Variante des Operons handelte, da es auf einem ähnlich großen Fragment wie das Colicin V-Operon nachzuweisen war (siehe Abschnitt 2.2.5, Abb. 10). Das zweite positive Signal trat bei einem ~ 813 kb großen DNS-Fragment auf und ist damit sehr wahrscheinlich chromosomal lokalisiert.

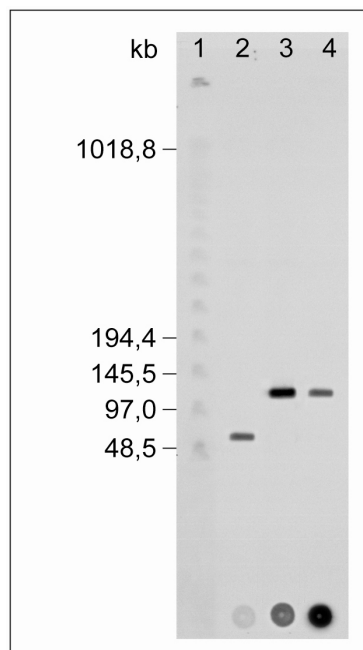


**Abb. 9 Autoluminogramm der DNS-DNS-Hybridisierungen von IMT5155 mit DNS-Sonden zum Nachweis der Lokalisation und Häufigkeit des Sit-Operons und der Siderophore Salmochelin.** Bakterien des APEC-Stammes IMT5155 wurden mit einer OD<sub>600</sub> 1 in Agaroseblöckchen eingebracht und *Xba*I restringiert. Die Auftrennung der restringierten DNS erfolgte in einer PFGE, die anschließend mittels Southern Blot auf eine Nylonmembran transferiert werden konnte. Vor Hitze-fixierung der DNS wurden PCR-Amplifikate von den jeweiligen Genen der nachzuweisenden Transportsysteme im Dot Blot-Verfahren rechts unten auf die Membran getropft (Positivkontrollen; links: Amplifikate des Salmochelin-Operons, rechts: Amplifikate des Sit-Operons). Die Membran wurde nachfolgend für DNS-DNS-Hybridisierungen zum Nachweis beider Transportsysteme genutzt. 1-  $\lambda$ -DNS-Leiter, 2- DNS-Sonde zum Nachweis des Sit-Operons, 3- DNS-Sonde zum Nachweis des Salmochelins



### 2.2.5 Lokalisation und Kopienzahl der virulenzassoziierten Gene *tsh* und *iss*

Für die Identifikation der Promotoren der p1ColV<sub>5155</sub>-codierten Gene *tsh* und *iss* und den nachfolgend geplanten Expressionsstudien (siehe Abschnitt 2.7) war die Bestimmung der Kopienzahl beider Gene bei IMT5155 von Bedeutung. Während die DNS-Sonde zum Nachweis von *tsh* (Primer: *tsh*.FP<sub>(132)</sub>/*tsh*RP<sub>(955)</sub>; 823 bp) ebenso wie die Sonden zur Identifikation des Colicin V- (Primer: *cviS*/*cvaS*; 598 bp) und des Sit-Operons (Primer: *sitD*.fp/*sitD*.rp; 639 bp) mit einem ~110 kb großen Genfragment von IMT5155 hybridisierten, ergab die Sonde zum Nachweis von *iss* (Primer: *iss* cdsfw/*iss* cdsrv; 309 bp) ein positives Signal mit einem kleineren DNS-Fragment (~57 kb; siehe Abb. 10). Da die DNS-Sonden für *tsh* und *iss* jeweils nur mit einem Fragment der IMT5155-DNS hybridisierten war zu vermuten, dass diese Gene nur mit einer Kopie im Gesamtgenom des Stammes auftreten.



**Abb. 10 Autoluminogramm der DNS-DNS-Hybridisierungen von IMT5155 mit DNS-Sonden zum Nachweis der Lokalisation und Häufigkeit der virulenzassoziierten Gene *iss* und *tsh*.** Vorbereitete Agarose-Blöckchen von IMT5155 für die PFGE (siehe Abschnitt 2.2.4) wurden über Nacht mit *Xba*I restringiert, in der PFGE aufgetrennt und auf eine neue Nylonmembran mittels Southern-Blot überführt. Der Erfolg der DNS-Hybridisierungen mit den DNS-Sonden zum Nachweis des ColV-Operons, sowie *iss* und *tsh* wurde über die PCR-Produkte der nachzuweisenden Gene, die als Positiv-Kontrollen ebenfalls auf die Membran getropft und hitzefixiert waren, kontrolliert (links: *iss*-Amplifikate, Mitte: *tsh*-Amplifikate, rechts: Amplifikate des ColV-Operons). 1-  $\lambda$ -DNS-Leiter, 2- DNS-Sonde zum Nachweis von *iss*, 3- DNS-Sonde zum Nachweis des ColV-Operons, 4- DNS-Sonde zum Nachweis von *tsh*

## 2.2.6 Replikations- und Transferregion mit flankierenden Sequenzen

Die Sequenzanalyse des Cosmidklons GB5155B27 ergab neben den mittels DNS-DNS-Hybridisierung bereits identifizierten Genen für das Colicin V-Operon und Tsh, den Nachweis des Replikationsursprungs RepFIIA mit den codierenden Sequenzen *repA2* und *repA3*, die die Replikation des Plasmids kontrollieren sowie den Nachweis des fertilitätsinhibierenden Proteins FinO (*finO*) und drei Genen der *tra*-Region (*traXID*). Die Replikations- und *tra*-Gene zeigten zu über 95 % Übereinstimmungen zu den entsprechenden Genen des F- [Acc. AF550679] bzw. pAPEC-O2-ColV-Plasmids [Acc. NC\_007675] und ließen damit die Vermutung zu, dass p1ColV<sub>5155</sub> ebenfalls durch die Genprodukte des *tra*-Operons konjugativ transferiert wird. Die in der Plasmidkarte dargestellte Abfolge der *tra*-Gene bei p1ColV<sub>5155</sub> stammt daher nicht aus der Sequenzanalyse des Plasmids selber, sondern aus der Veröffentlichung von pAPEC-O2-ColV [Acc. NC\_007675] (Johnson et al., 2006c). Direkt an die Transferregion schließt sich bei pAPEC-O2-ColV [Acc. NC\_007675] und pAPEC-O1-ColBM [Acc. DQ381420] eine genetische Region an, die die Voraussetzung für die stabile Weitergabe der jeweiligen Plasmide zwischen den Generationen darstellt und die auch für hochmolekularen F- [Acc. AP001918] und R100-Plasmide [Acc. AP000342] von *E. coli* beschrieben worden ist (Chlosta et al., 2006; Johnson et al., 2006b). Bei p1ColV<sub>5155</sub> ist diese Region Teil eines 31,8 kb großen Sequenzabschnitts, der bis zu 100 % Sequenzähnlichkeit zu entsprechenden Genen des Plasmids pU302L [Acc. AY333434] von *S. enterica enterica* Typhimurium (Stamm G8430) aufweist (Chen et al., 2007). pU302L ist 84 kb groß und vermittelt dem Bakterium Resistenzen gegen Ampicillin, Streptomycin, Tetrazyklin und Quecksilber. Die Sequenzähnlichkeit von pU302L und p1ColV<sub>5155</sub> umfasst sowohl die Abfolge als auch die Häufigkeit der Stabilitäts- und Erhaltungsgene. Hierzu gehören bei beiden Plasmiden drei Toxin-/Antitoxin-Loki (*ccdA/b* und zwei Sets von *vagC/D*) (Gerdes et al., 2005), die die Plasmidstabilität beeinflussen sowie *hok* und *sok*, deren Genprodukte die Abtötung plasmidfreier Zellen bedingen und durch *srnB* reguliert werden (Gerdes et al., 1997). Das SOS-Inhibierungssystem *psiA/B* dient zusammen mit *ssb* dem Schutz der einzelsträngigen Plasmid-DNS beim Übertritt in die Rezipientenzelle, indem es die SOS-Antwort unterdrückt und den Abbau der übergetretenen, einzelsträngigen 5'-Plasmid-Region verhindert (Helinski et al., 1996).

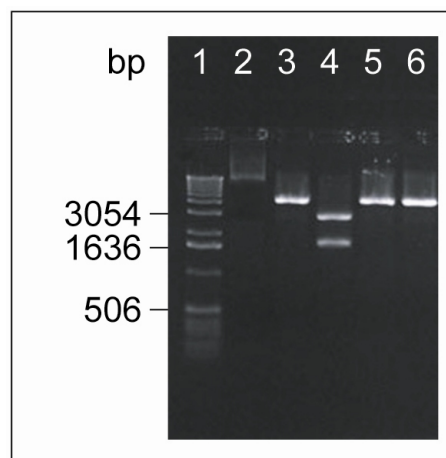
Die Sequenzähnlichkeit von pU302L [Acc. AY333434] und p1ColV<sub>5155</sub> umfasst nicht nur die Gene für die stabile Weitergabe und damit den Erhalt des Plasmids zwischen den Generationen, sondern auch sieben weitere *orfs*, deren translatierte Sequenzen keine Ähnlichkeiten zu den bislang bekannten Proteinen öffentlicher Datenbanken aufweisen (siehe

Abb. 7 und Anhang Tab. 14). Mit der Nukleotidsequenz des 340 Aminosäuren großen unbekannten Orf 137 setzt sich die zum *S. enterica enterica* Typhimurium Plasmid pU302L [Acc. AY333434] ähnliche DNS-Sequenz von p1ColV<sub>5155</sub> fort. Die DNS-Sequenz dieses Orfs lässt sich auch bei pAPEC-O2-ColV [Acc. NC\_007675] nachweisen, während alle weiteren Gene der hypothetische Proteine ab *orf138* fehlen. Die fehlende genetische Insel umfasst noch den, mit 3741 bp größten unbekannten *orf142* sowie die genetischen Informationen der Orfs 146, 147, 148, 149 und wird 1.102 bp stromabwärts von Aec53 [Acc. AAW51736] flankiert (Chouikha et al., 2006).

## 2.3 Charakterisierung von p2<sub>5155</sub>

### 2.3.1 Bestimmung der Plasmidgröße

Um die DNS-Sequenz von p2<sub>5155</sub> analysieren zu können, wurde von dem APEC-Stamm IMT5155 zunächst eine vollständige Kado-Lyse durchgeführt (Kado & Liu, 1981) und der Ansatz anschließend im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die p2<sub>5155</sub>-entsprechende Bande wurde aus dem Agarosegel isoliert, aufgereinigt und anschließend in einer Restriktionsanalyse mit verschiedenen Enzymen (*Bam*HI, *Hind*III, *Xba*I und *Eco*RI) auf Schnittstellen überprüft. Demnach konnte p2<sub>5155</sub> durch *Bam*HI, *Hind*III und *Xba*I linearisiert werden, während es durch *Eco*RI in zwei Fragmente (ca. 3,0 kb und 1,6 kb) restringiert wurde (siehe Abb. 11).

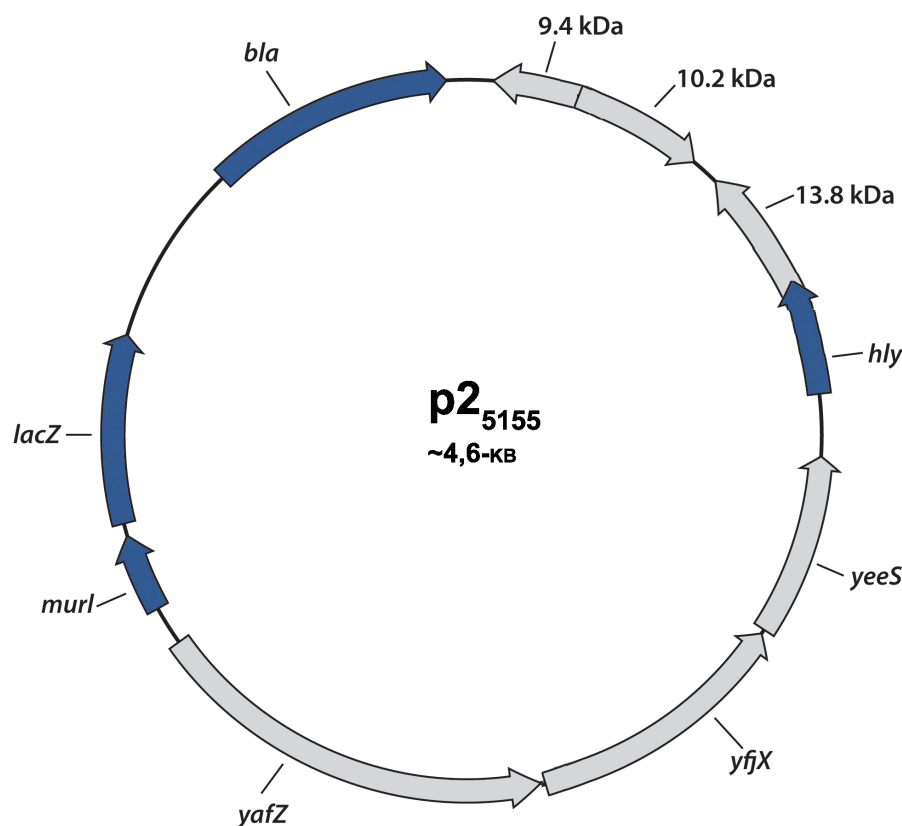


**Abb. 11 Elektropherogramm der Restriktionsmuster von p2<sub>5155</sub> mit verschiedenen Enzymen.** Jeweils 0,5 µg Plasmid-DNS wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit unterschiedlichen Enzymen (2,5 Units) restringiert und anschließend in einem 1 %-igen Agarosegel auf ihr Restriktionsmuster hin überprüft.

1- 1 kb-Marker; 2- p2<sub>5155</sub> (nicht restringiert); 3- p2<sub>5155</sub> (*Bam*HI-restringiert), 4- p2<sub>5155</sub> (*Eco*RI-restringiert); 5- p2<sub>5155</sub> (*Hind*III-restringiert); 6- p2<sub>5155</sub> (*Xba*I-restringiert).

Für die Sequenzanalyse von p2<sub>5155</sub> wurde mit den Fragmenten der *Eco*RI-Restriktion weiter gearbeitet, die eine geeignete Größe für die shot-gun Klonierung in den 4.244 bp großen Vektor pACYC184 aufwiesen (Selektion auf LB-Agar mit Tet, 20 µg/ml). Da gleichzeitig mit der *Eco*RI-Ligation eines p2<sub>5155</sub>-Fragmentes die Chloramphenicol-Resistenz von pACYC184 zerstört wurde, konnte durch Subkultivierung der Transformanten auf LB- und LB-Platten mit Cm (15 µg/ml) die Ligation überprüft und positive Klone identifiziert werden. Die Restriktionsanalyse der aus den Klonen isolierten rekombinanten Vektoren ergab den Nachweis des 1,6 kb großen Plasmidfragmentes. Ausgehend von der bekannten DNS-Sequenz des Klonierungsvektors pACYC184 wurden Primer für die Sequenzanalyse des p2<sub>5155</sub>-Fragmentes genutzt. Dessen Sequenzinformation ermöglichte die Synthese von weiteren Primern, mit denen anschließend das restliche Plasmid überlappend sequenzanalysiert werden konnte (LGC Genomics GmbH).

### 2.3.2 Genetische Organisation von p2<sub>5155</sub>

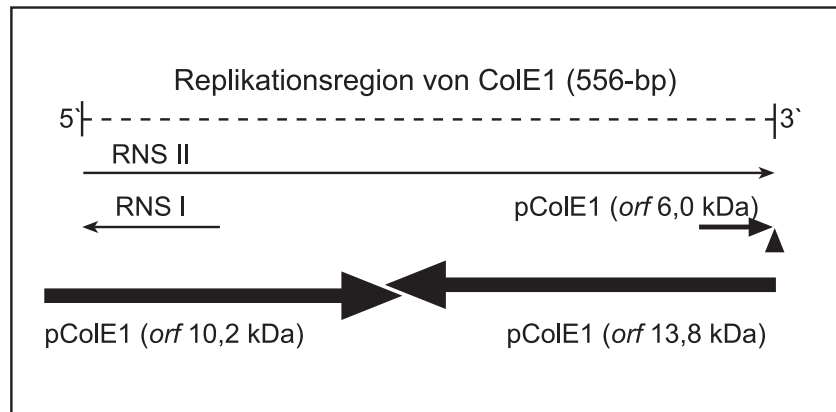


**Abb. 12 Grafische Darstellung der *orf*-analysierten DNS-Sequenz des IMT5155-Plasmids p2<sub>5155</sub>.** Blaue Pfeile kennzeichnen Gene mit bekannter Funktion und Transkriptionsrichtung, während die grauen Pfeile *orfs* von hypothetischen Proteinen wiedergeben.

Die sequenzbasierte Analyse des 4,6 kb großen Plasmids p2<sub>5155</sub> hatte, über einen DNS-Abschnitt von 1720 bp, 100 % Ähnlichkeit zu einem entsprechenden Abschnitt der Pathogenitätsinsel I des enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC)-Stammes RW1374 (O103:H2) (Jores et al., 2001) ergeben (siehe Abb. 12 und Anhang Tab. 15). Neben der Teilsequenz von *murL* [Acc. ADC29198] umfasst dieser DNS-Sequenzbereich noch die Gene von zwei hypothetischen Proteinen und YeeS [Acc. CAI43901], einem dem DNS-Reparatur-Protein RadC [Acc. NC\_000913] ähnlichem Protein im *E. coli* K12-Genom. Die DNS-Sequenz des ersten hypothetischen Proteins ergab 100 % Übereinstimmung zu *aec70* [Acc. AY857617] (Schouler et al., 2006; nicht publiziert) bzw. *yafZ*, einem Gen des UPEC-Stammes CFT073 [Acc. NC\_004431], das für ein Protein mit noch unbekannter Funktion codiert (Welch et al., 2002). Die DNS-Sequenz des zweiten *orfs* ist dem *orf41* aus der *pheV*-Region des EHEC-Stammes RW1374 zu 100 % ähnlich. Beide *orfs* entsprechen in ihrer DNS-Sequenz den Genen *aec72* [Acc. AY857617] des aviären *E. coli*-Stammes BEN2908 bzw. dem *yjfX* des *E. coli*-Stammes Nissel1917 [Acc. AJ586889] (Grozdanov et al., 2004), durch die ein hypothetisches Protein aus der Familie der Anti-Restriktionsenzyme codiert wird. Stromabwärts von *yeeS* [Acc. CAI43901] gelegen konnte die DNS-Teilsequenz des  $\alpha$ -Hämolysins nachgewiesen werden.

Mit einer Ähnlichkeit von über 90 % traten des Weiteren Übereinstimmungen von p2<sub>5155</sub> zu DNS-Sequenzbereichen des 6,6 kb großen ColE1-Plasmids [Acc. NC\_001371] auf, die die genetische Information der als 10,2 kDa [Acc. NP\_040359] und 13,8 kDa [Acc. NP\_040360] Orfs bezeichneten hypothetischen Proteine beinhalteten. ColE1 ist ein niedermolekulares Plasmid mit breitem Wirtsspektrum, hoher Kopienzahl, Mobilisierbarkeit und dem Colicin E1-Operon (Inoue & Uchida, 1991). Weder die Gene der Mobilität noch die des Colicin E1-Operons konnten auf p2<sub>5155</sub> nachgewiesen werden (siehe Tab. 15), jedoch beinhaltet der 557 bp umfassende DNS-Sequenzbereich von *orf* 10,2 [Acc. NP\_040359] und *orf* 13,8 [Acc. NP\_040360] die genetischen Loci von RNS I [GenID 2717251] und RNS II [GenID 2717251], sowie des Replikationsursprungs des ColE1-Plasmids [Acc. NC\_001371] und macht damit eine diesem Plasmid ähnliche Initiation der Plasmidreplikation von p2<sub>5155</sub> wahrscheinlich. Die Replikation von ColE1 [Acc. NC\_001371] erfolgt über die regulatorische Interaktion zweier RNS-Moleküle (siehe Abb. 13), die dem Replikationsursprung (*oriV*) vorgelagert sind. Die Initiation der Replikation benötigt die Anbindung des sogenannten RNS II-Primers (*pri*) [GenID 2717251] an den *oriV* und die vorgelagerte Sequenz. Die Regulation der Replikation erfolgt über das kurze RNS I-Molekül [GenID 2717251], das durch die ersten Nukleotide des gegenläufigen RNS II-Stranges (*inc*) [GenID 2717250]

codiert wird (Morita & Oka, 1979). Bindet RNS I [GenID 2717251] an RNS II [GenID 2717250], verhindert dies die Hybridisierung des RNS II-Primers [GenID 2717250] an den Replikationsursprung und damit die Replikation der nachfolgenden Plasmidgene (Lacatena & Cesareni, 1981). Sequenzen, die die RNS I/RNS II-Moleküle, sowie den Replikationsursprung codieren, konnten auf p2<sub>5155</sub> nachgewiesen werden.



**Abb. 13 Schematische Darstellung der RNS-vermittelten Replikation des ColE1-Plasmids.** Die Pfeile geben Anordnung und Orientierung der drei *orfs* (6,0 kDa, 10,2 kDa und 13,8 kDa) und der RNS I/RNS II-Moleküle wieder. Das vertikal dargestellte Dreieck zeigt den Transkriptionsstartpunkt des ColE1-Plasmids an.

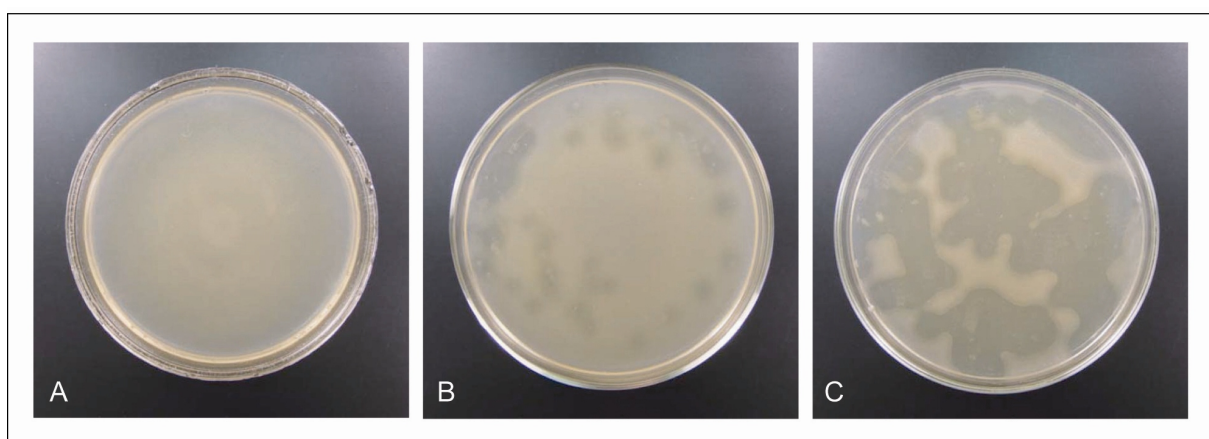
Stromaufwärts von der genetischen Information des 10,2 kDa Proteins [Acc. NP\_040359] von ColE1 [Acc. NC\_001371] befindet sich gegenläufig codiert der offene Leserahmen eines 9,4 kDa großen hypothetischen Proteins des 4,4 kb großen *E. coli*-Plasmid pBR322 [Acc. J017419] mit noch unbekannter Funktion. Der Replikationsursprung von p2<sub>5155</sub> wird stromaufwärts von dem  $\beta$ -Laktamase-Gen *bla* [Acc. CAB37325] flankiert, dessen Genprodukt *E. coli* eine Resistenz gegen Ampicillin vermittelt (siehe Abb. 12). Das 861 bp  $\beta$ -Laktamasegen ergab im DNS-Sequenzabgleich mit dem Gen von p2<sub>5155</sub> jedoch eine N'-terminale Verkürzung des Plasmidgens um 322 bp, womit das Genprodukt sehr wahrscheinlich funktionslos ist. Die Funktionslosigkeit der  $\beta$ -Laktamase [Acc. CAB37325] konnte mit einem Platten-Resistenztest auf LB-Agar mit 25 und 50  $\mu$ g/ml Amp bestätigt werden, die dem Wildtyp (IMT5155) kein normales Koloniewachstum ermöglichen. Auch das dem  $\beta$ -Laktamasegen stromabwärts benachbarte Gen der  $\beta$ -Galaktosidase *lacZ* [Acc. AAN78938] war im Vergleich zu dem 579 bp großen *orf* des *E. coli* K12-Stammes MG1655 [Acc. NC\_000913] mit 90 bp N'-terminal verkürzt (Sequenznachweis von 489 bp auf dem p2<sub>5155</sub>-Plasmid), kann jedoch theoretisch ein Alpha-Peptid des Gens exprimieren. Innerhalb des *lacZ*-Gens gibt es sechs verschiedene Stellen, an denen die mRNS-Bildung unterbrochen werden kann, wovon eine das sogenannte *lacZ*-Alpha-Peptid ergibt. Die Abbruchstellen innerhalb des Gens helfen bei entsprechend hohem intrazellulärem cAMP-

Spiegel den Gehalt an nicht translatierbarer RNS zu reduzieren. Vermutlich werden auf diese Art und Weise alle Katabolit-repressierbaren RNS-Moleküle innerhalb der Zelle reduziert (Graham et al., 1982). Das *lacZ*-Alpha-Peptid ist jedoch in der Lage, ein funktionsfähiges Peptid mit  $\beta$ -Galaktosidase-Eigenschaften zu produzieren.

## 2.4 Phänotypische Charakterisierung von p1ColV<sub>5155</sub>

### 2.4.1 Expression und Sekretion von Colicin V

Mikrozine sind strukturell nicht miteinander verwandte Peptide, die sensitive Bakterienstämme derselben Familie durch unterschiedlichste Aktivitätsmodi abtöten können. Das Mikrozin B17 z. B. blockiert die DNS-Gyraseaktivität sensibler Stämme (Vizan et al., 1991), das Heptapeptid Mikrozin C7 inhibiert die Proteinbiosynthese (Guijarro et al., 1995) und die Mikroazine E492 und ColV verhindern auf unterschiedliche Art und Weise die Ausbildung eines Membranpotentials und damit die energetische Versorgung der konkurrierenden Bakterienzellen (Lagos et al., 1993; de Lorenzo & Pugsley, 1985). Inwiefern der genetische Nachweis des ColV-Operons bei IMT5155 auch die Expression und Sekretion von Colicin V zur Folge hat, wurde in einem speziellen Plaque-Assay überprüft. Bei diesem Assay zeigen auftretende Plaques in einem ansonsten konfluenten Bakterienrasen eines Mikrozin-sensitiven Sammes, das sezernierte und die Zelllyse bewirkende Mikrozin der exprimierenden *E. coli*-Stämme auf. Offenbar sind Expression und/oder Effektivität des Mikrozins des APEC-Stammes IMT5155 bei annähernd gleicher Keimzahl deutlich höher als beim Referenzstamm ATCC 23588 (siehe Abb. 14).



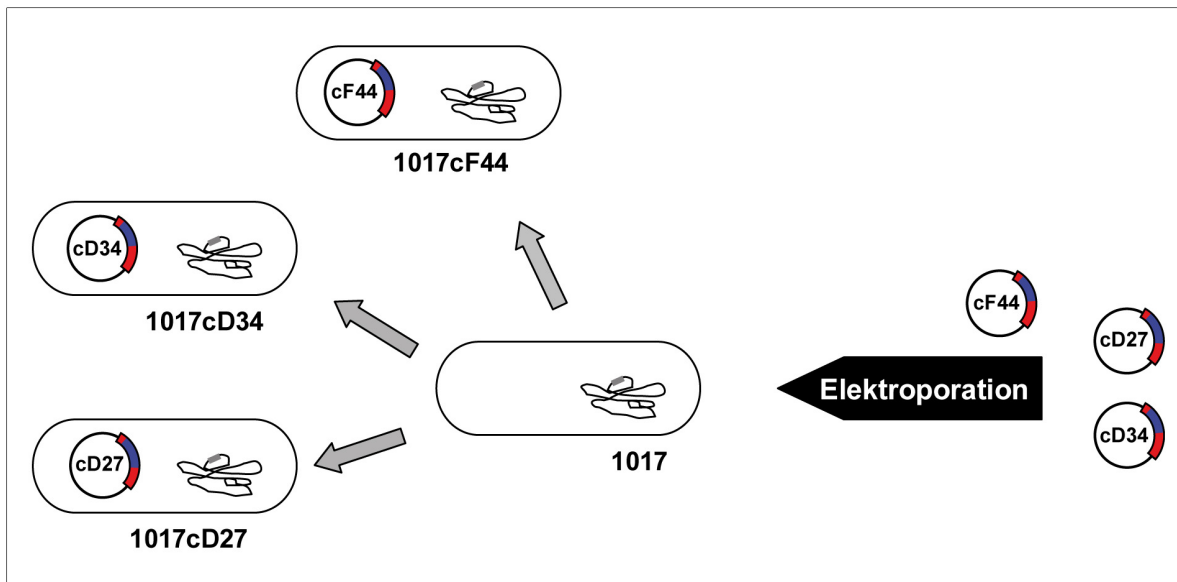
**Abb. 14 Expression und Sekretion von Colicin V verschiedener *E. coli*-Stämme im Plaque-Assay.** Übernachtskulturen der *E. coli*-Stämme ATCC 23558 (Colicin V-produzierend), IMT5155 und MG1655 wurden in frisches LB-Medium überimpft, bei OD<sub>600</sub> 1,5 (~ 1,0 x 10<sup>8</sup> Zellen/ml) ausplattiert und über Nacht inkubiert. Die Bakterien wurden durch Auflage von Chloroform-getränkten Filtern abgetötet und, mit dem in LB-Weichagar suspendiertem *E. coli* ATCC-Stamm 23559 (Colicin V-sensitiv) überschichtet und erneut über Nacht inkubiert. (A) MG1655 (Negativ-Kontrolle), (B) *E. coli* ATCC 23558 (Positiv-Kontrolle), (C) IMT5155

## 2.4.2 Sekretion und Funktionalität eischelatierender Systeme

Um Eisenionen aus nahezu unlöslichen anorganischen Eisenverbindungen oder aus dem Zentrum organischer Verbindungen für sich verfügbar zu machen, produzieren Prokaryonten spezifische eisenbindende Chelatoren (Siderophoren). Hydroxamat-Siderophoren, die Derivate der Hydroxaminsäure (z. B. Aerobaktin) und Catechol-Siderophoren, die als aromatische Verbindung Catechol enthalten (z. B. Enterobaktin und Salmochelin), haben eine hohe Bindungsaffinität zu dreiwertigem Eisen (Barron & Templeton, 2002). Expression und Sekretion beider Siderophorentypen aus der Bakterienzelle kann mit Hilfe des Chrom-Azurol-S (CAS)-Agars nachgewiesen werden (Schwyn & Neilands, 1987). In diesem Agar wird ein Komplex aus Chrom-Azurol-S, Eisen<sup>3+</sup> und HDTMA als Indikator genutzt. Wenn starke prokaryotische Chelatoren das Eisen aus dem Komplex lösen, wird dies durch einen Indikatorumschlag des Agars von blau-grün nach gelb sichtbar. Sequenzanalysen einzelner Cosmidklone von IMT5155 haben zum Nachweis der plasmidcodierten Eisentransportsysteme Aerobaktin, Salmochelin und des Sit-Operons auf drei separaten Klonen (GB5155D27, GB5155F44 und GB5155D34) geführt. Die Expression des Aerobaktin- und Salmochelin-Operons wird offenbar bei den einigen ColV-Plasmiden durch den Regulator Fur („ferric uptake regulator protein“) bestimmt. Fur ist ein globaler Repressor innerhalb der bakteriellen Zelle, der Fe<sup>2+</sup>-Ionen als Co-Repressor nutzt und bei ausreichender Eisenversorgung die Transkription eisenregulierter Gene durch Anbindung an spezifische Operatorsequenzen innerhalb der jeweiligen Promotorregion blockiert (Lee & Helmann, 2007). Erste umfassende Untersuchungen am Aerobaktin-Promotor des Plasmids ColV-K30 [Acc. AJ223631] eines humanpathogenen *E. coli*-Stammes hatten gezeigt, dass dieser Promotor in zwei Regionen unterteilt ist, wovon die dem Gen direkt anschließende, proximale Region zwei Fur-Boxen enthält, während der Promotor der zweiten, distalen Region keine Ähnlichkeit zu dem eisenabhängigen Regulator aufweist (Escolar et al., 2000). Der Sequenzvergleich des pColV-K30 [Acc. AJ223631] Aerobaktin-Promotors mit der vorgelagerten Region des p1ColV<sub>5155</sub>-Aerobaktins von GB5155B27 hatte ergeben, dass das aviäre Plasmid offenbar nur den distalen Promotor und damit keine, dem Aerobaktin unmittelbar vorgelagerte Fur-Sequenz aufweist. Anders ist es bei dem Salmochelin-Operon von p1ColV<sub>5155</sub> bei GB5155F44, wo sich 185 bp vor *iroB* mit großer Ähnlichkeit eine Bindestelle für Fur nachweisen ließ, ebenso, wie 78 bp vor *sitA* bei GB5155D34.

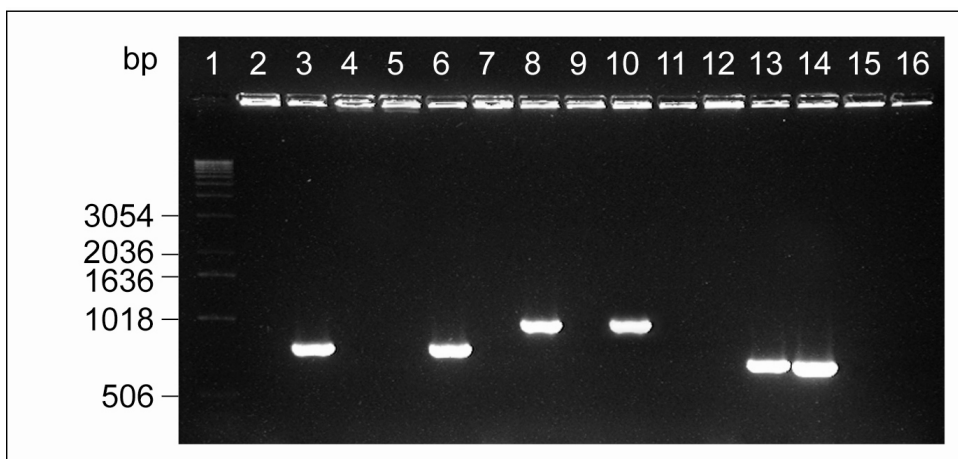


Um eine Vorstellung davon zu bekommen, ob die unterschiedlichen Eisentransportsysteme des ColV<sub>5155</sub>-Plasmids auch ausgehend von ihrem Cosmid bei Eisenmangel exprimiert und aktiv sezerniert werden können, wurden die Cosmide (cF44, cD34, cD27) mittels „Large Construct Kit“ (Qiagen) isoliert und in die Enterobaktin-defiziente *E. coli*-Mutante von HB101 (1017) (Daskaleros et al., 1991) elektroporiert (siehe Abb. 15).



**Abb. 15 Transformation von *E. coli* 1017 mit verschiedenen Cosmiden aus der Genbank von IMT5155.** Der *E. coli* K12-Stamm HB101 wurde durch eine Transposon-Insertion (Tn5; grauer Balken im Chromosom) in die Enterobaktin-defiziente Mutante 1017 überführt. Da der Nachweis der drei plasmidcodierten Eisentransportsysteme (cF44; Salmochelin, cD34; Sit-Operon, cD27; Aerobaktin-Operon) auf separaten Cosmiden gelang, wurden diese jeweils in *E. coli* 1017 elektroporiert und für nachfolgende Versuche eingesetzt.

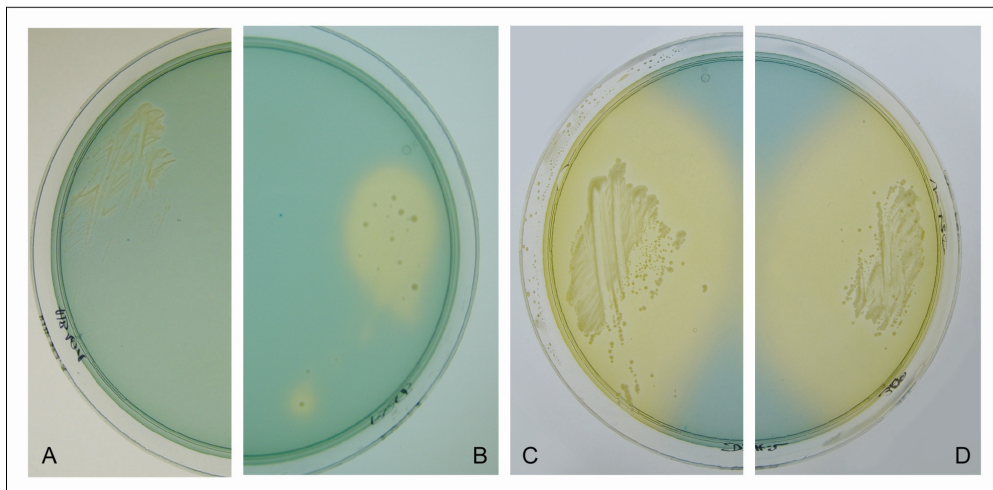
Mittels PCR wurde das separate Auftreten der verschiedenen ABC-Transporter in dem neuen genetischen Hintergrund überprüft (siehe Abb. 16). Demnach wieß 1017cD27 das Cosmid von GB5155D27 und damit das Aerobaktin-Operon, 1017cF44 das Salmochelin-Operon von GB5155F44 und 1017cD34 das Sit-Operon (GB5155D34) auf.



**Abb. 16 Elektropherogramm von Genen verschiedener Eisentransportsysteme der Cosmide cD27, cF44 und cD34.** Für die PCRs wurden Bakterienkolonien gepickt und für den spezifischen Nachweis von Aerobaktin (*iucD.fp/iucD.rp*; 710 bp), Salmochelin (*iroN.FP<sub>(16)</sub>/iroN.RP<sub>(862)</sub>*; 846 bp) und des Sit-Operons (*sitD.fp/sitD.rp*; 639 bp) eingesetzt.

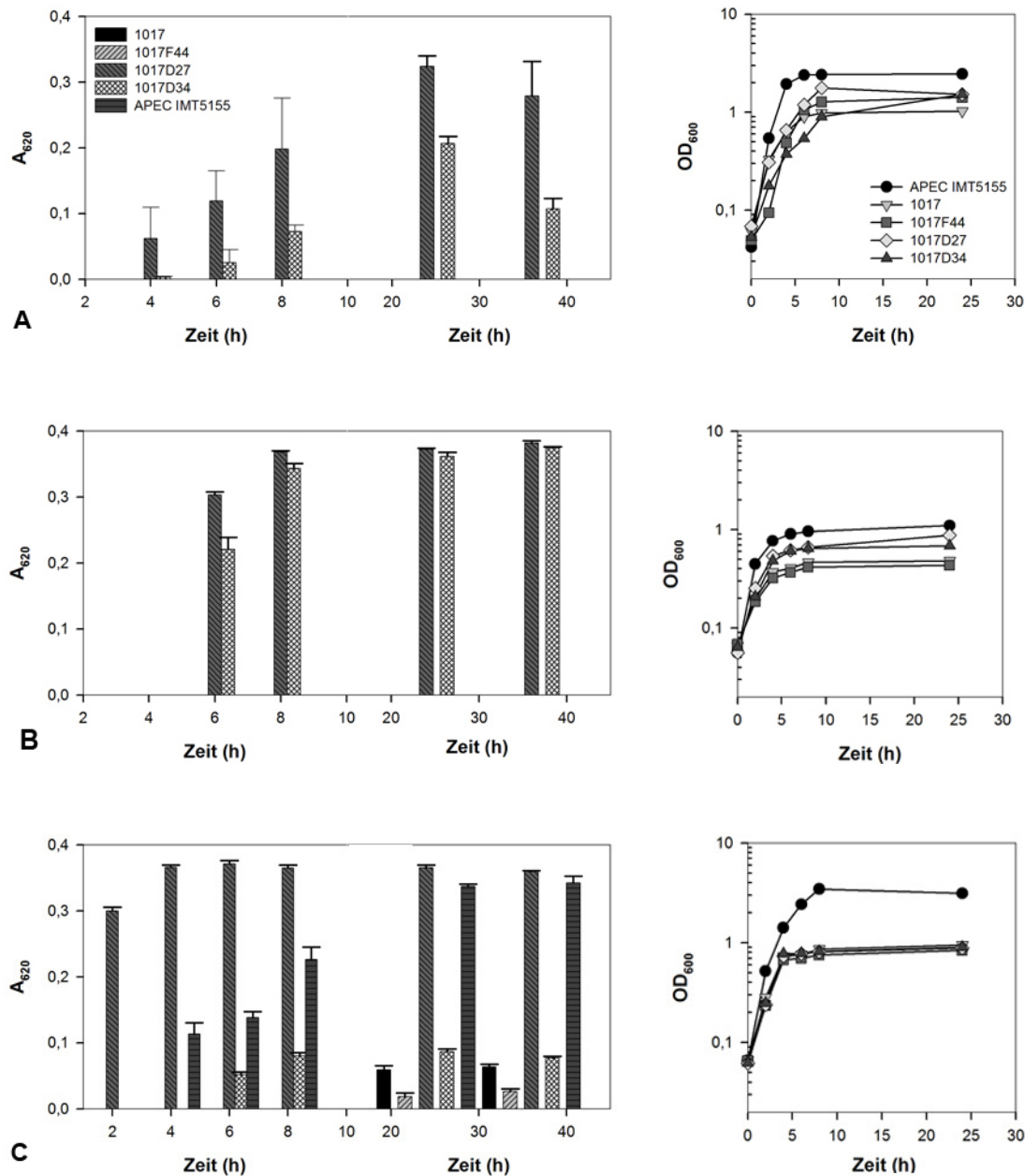
1- 1-kb-Marker, 2- 1017; Nachweis von Aerobaktin (Negativ-Kontrolle), 3- IMT5155; Nachweis von Aerobaktin (Positiv-Kontrolle), 4- 1017cD34; Nachweis von Aerobaktin, 5- 1017cF44; Nachweis von Aerobaktin, 6- 1017cD27; Nachweis von Aerobaktin, 7- 1017; Nachweis von Salmochelin (Negativ-Kontrolle), 8- IMT5155; Nachweis von Salmochelin (Positiv-Kontrolle), 9- 1017cFD34; Nachweis von Salmochelin, 10- 1017cF44; Nachweis von Salmochelin, 11- 1017cD27; Nachweis von Salmochelin, 12- 1017; Nachweis des Sit-Operons (Negativ-Kontrolle), 13- IMT5155; Nachweis des Sit-Operons (Positiv-Kontrolle), 14- 1017cD34; Nachweis des Sit-Operons, 15- 1017cF44; Nachweis des Sit-Operons, 16- 1017cD27; Nachweis des Sit-Operons

Für die Überprüfung der Transformanten auf CAS-Agar wurden die Stämme jeweils bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,5 in LB-Bouillon angezogen, bevor ihnen der Eisenchelators DIP zugesetzt wurde. Ausgehend von diesen Kulturen erfolgte ab einer  $OD_{600}$  von 1 der Ausstrich auf CAS-Platten, wo nach einer Bebrütung über Nacht starkes Bakterienwachstum und große, gelbe Koloniehöfe die Expression der Siderophore Aerobaktin und die Akquirierung von Eisen<sup>3+</sup>-Ionen durch das Sit-Operon aufzeigten, während die Salmochelin-Transformante zwar ebenfalls einen Farbumschlag des Agars erkennen ließ, allerdings bei deutlich schlechterem Wachstum (siehe Abb. 17).



**Abb. 17 Nachweis der Expression und Sekretion verschiedener eisenakquirierender Chelatoren mit Hilfe des CAS-Agars.** Vor dem Ausstrich auf CAS-Agar wurden jeweils 100  $\mu$ l der Bakterien-suspension im Doppelansatz pelletiert und nach zweimaligen Waschvorgängen in 100  $\mu$ l PBS suspendiert, wovon 10  $\mu$ l im Dreistrichverfahren auf dem Agar ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht bebrütet wurden. (A) 1017 (Negativ-Kontrolle), (B) 1017cF44, (C) 1017cD27, (D) 1017cD34

In dem Plattentest können die Durchmesser der gelben Höfe für eine quantitative Auswertung der Sekretion von Siderophoren genutzt werden, da sich diese unabhängig von der Größe der Kolonie ausbilden. Allerdings kann mit Hilfe eines flüssigen CAS-Assays eine genauere Auswertung der sezernierten Siderophoren durch die Auswertung des Farbumschlags mittels Photometer erfolgen. Zudem ermöglicht es diese Methode, den Einfluss verschiedener Wachstumsbedingungen auf Expression und Sekretion von Siderophoren zu untersuchen. Die zusätzliche Bestimmung der KbE/ml bezieht das Wachstum mit ein und lässt erkennen, inwiefern die Sekretion mit der Anzahl Bakterien korreliert (siehe Abb. 18 A-C).



**Abb. 18 Nachweis der Expression und Sekretion verschiedener eisenakquirierender Chelatoren in Abhängigkeit von unterschiedlich supplementierten Medien.**

Die Expression und Sekretion von eisenakquirierenden Chelatoren durch 1017cD27, 1017cD34 und 1017cF44 wurde in Minimalmedium M9 (A) und in M9, supplementiert mit 65 µM des Eisenchelators DIP (B) bzw. mit 100 µM DIP (C) getestet. Nach 2, 4, 6, 24 und 36 Stunden Wachstum wurde von einem Aliquot die Anzahl KfE/ml bestimmt, sowie 1 ml Bakterienkultur für den flüssigen CAS-Assay abzentrifugiert und der Überstand bei -20 °C eingefroren. 100 µl der gesammelten Bakterienüberstände wurden nach dem Auftauen mit derselben Menge CAS-Lösung versetzt, für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Siderophorenproduktion durch Messung des Absorptionswertes  $A_{620}$  photometrisch bestimmt. Die grafische Auswertung beinhaltet Werte, die folgendermaßen errechnet wurden:  $A_{620}$  (CAS-Indikatorlösung und M9) –  $A_{620}$  (CAS-Indikatorlösung mit bakteriellem Überstand). Die bakteriellen Flüssigkulturen wurden im Doppelansatz inkubiert und mit dreifacher Wiederholung im CAS-Assay eingesetzt.

Die Assays mit der CAS-Indikatorlösung ergaben im Minimalmedium M9 eine von der Inkubationszeit bzw. Bakterienanzahl abhängige Siderophoren-Produktion der Aerobaktin-Transformante 1017cD27 (siehe Abb. 18 A). Bis zum Erreichen der stationären Phase (nach etwa 8 h) korrelierte die Sekretion der Siderophore mit der steigenden Anzahl Bakterien. Nach 24 h hingegen war das Bakterienwachstum leicht rückläufig, während die Produktion der Siderophoren auf den höchsten Wert ( $A_{620}$  0,324 nm) angestiegen war. Auch die Transformante 1017cD34, mit dem codiert vorliegenden Sit-Lokus, exprimierte verstärkt Proteine ins M9-Medium, die das Herauslösen von Eisenionen aus dem farbigen CAS-Komplex ermöglichten. Die Freisetzung des Eisens aus dem Komplex nahm auch bei 1017cD34 mit steigender Zellzahl zu, lag jedoch bei einer Absorption (620 nm) von 0,207 niedriger als 1017cD27 bei einer ähnlich hohen Anzahl Bakterien/ml. Der APEC-Stamm IMT5155, die Negativ-Kontrolle 1017 (Daskaleros et al., 1991) und die Transformante mit dem Salmochelin-Lokus (1017cF44) wiesen im M9-Medium keine messbare Siderophoren-Produktion auf. Durch die Zugabe des Eisenchelators DIP (65  $\mu$ M) und die damit verbundene Reduktion des für die Bakterien frei verfügbaren Eisens, erhöht sich das Niveau der sezernierten Chelatoren von 1017cD27 und 1017cD34 deutlich ( $A_{620}$  0,375 und  $A_{620}$  0,382 nm) bei gleichzeitig supprimiertem Bakterienwachstum (nach 24 h  $OD_{600} < 1$ ; siehe Abb. 18 B). Durch den Zusatz von  $Fe_3Cl$  (40  $\mu$ M) zu dem mit 65  $\mu$ M DIP supplementierten M9-Medium konnte, bei einem gleichzeitig verbesserten Wachstum aller Stämme, die Reduktion des Eisens im Medium kompensiert und bei keinem der untersuchten Stämme eine Sekretion von Chelatoren nachgewiesen werden. Die Zugabe von 100  $\mu$ M DIP beeinträchtigte das Wachstum aller Stämme so stark, dass mit Ausnahme des Wildtyps kein weiterer Stamm  $OD_{600}$  1 erreichen konnte (siehe Abb. 18 C). Trotzdem wies die 1017cD27-Transformante unter diesen Bedingungen nach 2 h einen Absorptionswert von  $A_{620}$  0,3 nm auf. Das Sit-Transportsystem setzte erneut nach 6 h mit dem messbaren Abbau von  $Fe^{3+}$ -Ionen aus dem farbigen Komplex ein, wobei der photometrisch ermittelte Absorptionswert deutlich niedriger ( $A_{620}$  0,05-0,08 nm) als bei einer Supplementation von 65  $\mu$ M DIP lag. Auch bei dem Wildtyp IMT5155 konnte nach 2 h die Sekretion von eisenakquirierenden Chelatoren nachgewiesen werden, deren Absorptionswerte mit zunehmender Wachstumdauer auf über  $A_{620}$  0,3 nm anstieg. Da nach 24 h Wachstum im M9-Medium mit 100  $\mu$ M DIP bei allen Stämmen, allerdings auch die Negativ-Kontrolle (1017) eine Absorption ( $A_{620}$  0,064 nm) messbar war, sind die ermittelten Werte ab diesem Zeitpunkt nicht zu werten.

### 2.4.3 Erzeugung einer p1ColV<sub>5155</sub>-freien IMT5155-Mutante

Das Auftreten hochmolekularer Plasmide in Bakterien ist zumeist mit einem positiven Selektionsdruck versehen, da sie Träger stoffwechselphysiologisch relevanter und/oder virulenzassoziierter Gene sind, deren Expression zu einem bestimmten Zeitpunkt des bakteriellen Lebenszyklusses von Bedeutung sind. Zur Aufklärung der Bedeutung hochmolekularer Plasmide für den Wirtstyp tragen Folgeuntersuchungen an plasmidfreien Bakterienstämmen bei. Liegen keine originär plasmidfreien Stämme zum Vergleich vor, kann durch spezielle Techniken und Agenzien ein Plasmidverlust provoziert werden. Dieses Vorgehen nennt man „Plasmid-curing“ (lat. „*curare*“ = heilen, „Plasmidheilung“). Die verschiedenen Curing-Methoden nutzen unterschiedliche physiologische Angriffspunkte, da nicht jede Methode für jedes Plasmid erfolgreich angewandt werden kann (Dale & Park, 2004). Häufig verhindern eine Vielzahl verschiedener Proteine, die auf dem Plasmid codiert vorliegen, den Verlust desselben innerhalb der Bakterienpopulation und macht das Plasmid-curing sehr problematisch.

#### I. Konjugation mit Plasmiden der gleichen Inkompatibilitätsgruppe (Dale & Park, 2004)

Plasmide mit gleichem Replikationsmechanismus gehören zu einer Inkompatibilitätsgruppe, die nicht nebeneinander in einem Bakterium existieren können, da sie während der bakteriellen Zellteilung dieselben Replikationsproteine für eine stabile Weitergabe benötigen (Dale & Park, 2004). Das F-Plasmid des *E. coli*-Stammes JC9387 [Coli Genetic Stock Center; CGSC Stamm 6613] (Barbour et al., 1970) gehört wie p1ColV<sub>5155</sub> zur Inkompatibilitätsgruppe I und codiert eine Tetrazyklin-Resistenz. Der Versuch des konjugativen Übertritts des F-Plasmids von JC9387 in IMT5155, um darüber den Verlust des ColV-Plasmids zu erwirken, erfolgte in LB-Bouillon mit anschließender Selektion auf Minimalmedium (M9-Agar) mit Antiinfektivum (Tet 15 µg/ml). Da JC9387 aufgrund von 22 Mutationen in Genen des Stoffwechsels nicht in der Lage ist auf M9-Agar zu wachsen, lassen sich hier nur IMT5155-Transformanten mit dem Resistenz vermittelnden F-Plasmid nachweisen. Insgesamt drei Parallelansätze wurden zwei Mal am Tag (morgens und abends) über einen Zeitraum von 7 Tagen in frisches LB-Medium überführt und pro Ansatz 50 µl Suspension auf jeweils 25 supplementierten M9-Agarplatten am Abend ausplattiert. Kolonien, die auf dem Agar nachzuweisen waren, wurden zur Absicherung noch einmal parallel auf supplementierten M9- und LB-Platten gepickt, um den Selektionsdruck auf die einzelnen Kolonien zu erhöhen. Alle überprüften Klone waren auf den Selektivplatten allerdings negativ.

## II. Zugabe verschiedener chemischer Agenzien

Phänotypische Untersuchungen an p1ColV<sub>5155</sub> wurden wesentlich durch die Tatsache erschwert, dass das Plasmid natürlicherweise keine Resistenzen gegen Antiinfektiva codiert. Platten-Assays, bei denen IMT5155 auf verschiedenen supplementierten LB-Agarplatten (Amp; 30 µg/ml, Kan; 25 µg/ml, Tet; 10 µg/ml, Stm; 80 µg/ml, Spm; 80 µg/ml, Nal; 50 µg/ml) ausgestrichen wurde, ergab für alle Antiinfektiva eine Sensibilität des Stammes. Demnach gab es keinen p1ColV<sub>5155</sub>-spezifischen Selektionsmarker, über den phänotypische Veränderungen aufgezeigt werden konnten. Vorangegangene Arbeiten an IMT5155 hatten zum Nachweis zweier Mutanten (M00D01 und M00F07) geführt, bei denen durch die Methode der „Signature-tagged Mutagenese“ Kanamycin-markierte Transposons in Gene des p1ColV<sub>5155</sub>-Plasmids transduziert waren (Li et al., 2005). Bei M00D01 handelt es sich um eine Mutante von IMT5155, bei der eine Deletion im *traG* der *tra*-Region des Plasmids p1ColV<sub>5155</sub> (p1D01) nachzuweisen war, während bei M00F07 das Transposon in *f07* inseriert war (p1F07), einem Gen der zu pU302L [Acc. AY333434] ähnlichen Sequenzabfolge (siehe Abschnitt 2.2.3; Li et al., 2005). Bei der vorliegenden Arbeit basiert der überwiegende Teil an gewonnenen phänotypischen Untersuchungsergebnissen auf der Verwendung der IMT5155-Insertionsmutante M00D01 bzw. deren p1ColV<sub>5155</sub>-Plasmid (p1D01).

### II a. Verwendung DNS-interkalierender Farbstoffe (Dale & Park, 2004; Riva et al., 1973; Hirota, 1959)

F-Plasmide lassen sich unter Verwendung interkalierender Farbstoffe wie Acridinorange und Ethidiumbromid aus ihrem Wirtstamm entfernen. Der eingelagerte Farbstoff stört die Polymerase I bei ihrer Verdopplungssynthese des singulären Plasmidstranges in stärkerem Maße als die chromosomale DNS, bei der die zelleigenen Reparaturmechanismen die Einlagerung beseitigt. Inwiefern eine fehlerhafte Replikation die korrekte Weitergabe des ColV-Plasmids auf die Tochterzellen verhindern kann, sollte durch Wachstum von M00D01 in LB-Medium mit 20 µg/ml Acridinorange bei 37 °C ausgetestet werden.

### II b. Behandlung mit Sodiumdodecylsulfat (SDS) (Dale & Park, 2004; Inuzuka et al., 1969)

SDS ist ein Detergenz, das in der Proteinbiochemie eine Rolle spielt, da es Proteine durch Aufheben nicht-kovalenter Bindungen denaturiert. Bei gramnegativen Bakterien vermag sich SDS infolge seiner amphiphatischen Eigenschaften in die Phospholipidschicht äußerer Zellmembranen einzulagern und bedingt darüber eine Instabilität der Zellwand. Da hochmolekulare Plasmide die Initiation zur Zellteilung über die Zellwand vermittelt bekommen, versucht man durch Zugabe von SDS Replikationsfehler hervorzurufen, die nach

mehreren Zellteilungen letztendlich zum Verlust des Plasmids und damit zu einer plasmidfreien Bakterienpopulation führen sollen (Sonstein & Baldwin, 1972). Für diese Behandlung wurde M00D01 in Penassy-Bouillon mit 10 % (w/v) SDS bei 37 °C angezogen.

### III. Wachstum in reichhaltigem Medium bei hoher Temperatur (Dale & Park, 2004)

Das Wachstum von M00D01 in reichhaltigem Medium (BHI) bei hoher Temperatur (45 °C) sollte durch Kombination von zwei physiologischen Angriffspunkten den Verlust des hochmolekularen Plasmids hervorrufen. So werden virulenzassoziierte Gene und/oder Gene für bestimmte stoffwechselphysiologische Eigenschaften i. d. R. nur unter Bedingungen exprimiert, die einen Mangel signalisieren. Gleichzeitig sollte durch das Anheben der Wachstumstemperatur auf ein subletales Niveau der Stress für die Bakterien erhöht werden. Eine Kombination aus guter Nährstoffversorgung und Temperaturstress bedingt häufig, dass die aufwendige Replikation großer Plasmide nicht mehr in jeder Bakterienzelle stattfindet und darüber langfristig ein Plasmidverlust innerhalb der Population hervorgerufen werden kann.

Mit allen Methoden wurde insgesamt über 35 Passagen (ca. 438 Generationen) lang versucht, den Verlust des ColV-Plasmids aus der IMT5155-Mutante M00D01 zu provozieren. Bei einer Rate von  $8,8 \times 10^3$  überprüfter Bakterienkolonien konnte jedoch keine plasmidfreie Variante des Stammes nachgewiesen werden, während hingegen das ColV-Plasmid pTJ100 [Acc. AY\_553855] des mitgeführten APEC-Kontrollstammes 2363 (Wooley et al., 1994) unter denselben Bedingungen verloren ging. Der Plasmidverlust trat hier nach 8 Passagen in BHI und nach 32 Passagen in LB-Bouillon mit Acridinorange auf.

#### 2.4.4 Konjugationsversuche mit M00D01

Die Erforschung der spezifischen Eigenschaften hochmolekularer Plasmide wird erleichtert, sofern diese durch eigene Übertragung (Konjugation) in einen Bakterienstamm mit bekanntem chromosomalen Hintergrund übertreten können. Aufgrund des sequenzanalytischen Nachweises von *traXID* bei p1ColV<sub>5155</sub> wurde vermutet, dass auch dieses ColV-Plasmid konjugativ verbreitet wird. Für die Erzeugung von Transkonjuganten wurde die IMT5155-Mutante M00D01 (p1D01, *traG*::Tn5*km2*) als plasmidspendender Donorstamm und der *lacZ*-negative *E. coli* K12-Stamm KT2442 (MG1655Δ*lacIZ*rph<sup>+</sup>) als Akzeptor bei einem Konjugationsversuch in Flüssigmedium eingesetzt. Der Versuch wurde parallel mit dem APEC-Stamm 2363 als Positivkontrolle durchgeführt (Wooley et al., 1994). Während unter diesen Konjugationsbedingungen für das Kontrollplasmid pTJ100 [Acc. AY\_553855] auf



entsprechend supplementierten MacConkey-Agarplatten (Amp<sup>R</sup>, Tet<sup>R</sup>) hellrote *lac*-negativen Kolonien nachweisbar waren, gelang dies für p1D01 nicht.

Der Konjugationsversuch wurde auf Agarplatten wiederholt, die zur Stabilisierung des Pilus mit einem GS Milipore Filter (0,22 µm) versehen waren. Aber auch mit dieser Methode gelang nur die erfolgreiche Transformation mit dem Kontrollplasmid pTJ100.

### **Transduktions-Assay mit P1vir**

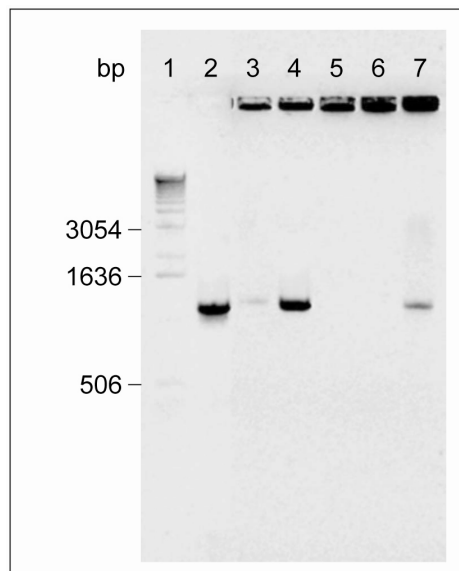
Um Informationen darüber zu erhalten, inwiefern IMT5155 zur Ausbildung von F-Pili befähigt ist, wurde ein Transduktions-Assay durchgeführt. Mit der Ausbildung des F-Pilus konjugativer ColV-Plasmide geht häufig eine Affinität für männliche Phagen einher (Hardy, 1975). Neben dem F-Pilus sind äußere Membranproteine, aber auch die Polysaccharide von Kapseln Angriffsorte für Phagen. Im Labor bietet die unspezifische Phagentransduktion eine einfache und bei *E. coli*-Stämmen weit verbreitete Möglichkeit zur Herstellung isogener Mutanten, für die häufig der Phage P1vir verwendet wird (Franklin, 1969; Ornellas & Stocker). Für die Transduktion von IMT5155 wurde eine Kolonie in 5 ml LB-Bouillon (mit 10 mM MgSO<sub>4</sub> und 5 mM CaCl<sub>2</sub>) angeimpft und bis zur leichten Trübung der Bouillon inkubiert (37 °C, 200 rpm). 100 µl der Bakteriensuspension wurde mit 20 µl P1vir-Lysat versetzt und weiter inkubiert. Der komplette Ansatz wurde in ein Röhrchen mit verflüssigtem LB-Weichagar überführt und auf einer LB-Agarplatte ausgebracht, die nach Verfestigung über Nacht bebrütet wurde. In dem konfluenten Bakterienrasen waren keine Plaques erkennbar, die darauf hätten schließen lassen, dass der Phage sich an die Bakterienzellen angeheften, reproduzieren und eine Zelllyse verursachen konnte.

#### **2.4.5 Transformation von p1D01 in einen *E. coli* K12-Stamm**

Neben der Konjugation gibt es noch die Möglichkeit der Transformation isolierter DNS in einen Rezipientenstamm. Zu diesem Zweck wurde p1D01 entsprechend der Megaplasmid-Isolierung nach Nies (Nies et al., 1987) isoliert und die Rezipientenzellen des *E. coli* K12-Stammes DH5 in die Bereitschaft zur Aufnahme isolierter Plasmid-DNS versetzt (kompetenter Zustand). DH5 besitzt im Gegensatz zu dem *E. coli* K12-Stamm MG1655 [Acc. NC\_000913] den Vorteil der erleichterten Aufnahme großer Mengen fremder DNS, wodurch allerdings umfassendere gentechnische Veränderungen des Stammes notwendig waren. Der Nachweis der Aufnahme von Plasmid-DNS durch DH5 erfolgte zunächst über Kanamycin-supplementierte LB-Agarplatten (50 µg/ml) bevor genotypische Untersuchungen folgten.

### PCR-geführter Nachweis des Übergangs von p1D01 in DH5

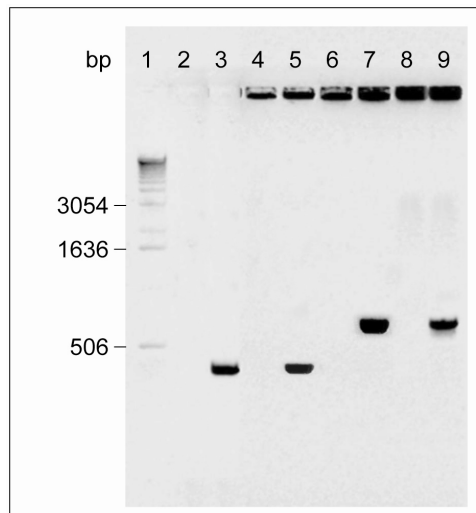
Die DH5-Transformante mit p1D01 (IMTp1D01) wurde zunächst durch eine *cvi/cvaA*-PCR in Bezug auf das plasmidspezifische ColV-Operon untersucht. Drei der fünf überprüften Transformanten waren positiv, wovon eine nachfolgend auf die Expression spezifischer Plasmidgene untersucht wurde (siehe Abb. 19).



**Abb. 19 Elektropherogramm der PCR zum Nachweis des ColV-Operons in verschiedenen Transformanten (IMTp1D01; Klon 1-5).** Von den Transformanten und IMT5155 wurden Kolonien von LB-Agarplatten gepickt und in einer ColV-spezifischen PCR (*cvi/cvaA*; 1.180 bp) überprüft. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte von 10 µl des PCR-Ansatzes in einem 1 %-igen Gel. 1- 1-kb-Marker, 2- IMT5155 (Positivkontrolle), 3-7 IMTp1D01; Klon 1-5.

### Expression plasmidspezifischer Gene von IMTp1D01

Für den Nachweis der Expression von *iss* und den Genen des Aerobaktins im genomischen Hintergrund des *E. coli* K12-Stammes DH5 wurde die Kolonie von IMTp1D01 über Nacht in LB-Bouillon inkubiert und entsprechend der Anleitung des „SV Total RNA Isolation Systems“ (Promega) mRNS isoliert. Mittels Random-Priming erfolgte die Synthese von cDNS und nachfolgend der PCR-geführte Expressionsnachweis von *iss* (Primer: *iss cdsfw/iss cdsrv*; 309 bp) und *iucD* (Primer: *iucD.fp/iucD.rp*; 710 bp) des Aerobaktin-Operons (siehe Abb. 20).



**Abb. 20 Elektropherogramm zum Nachweis der Expression von *iss* und *iucD* in IMTp1D01.** Die Isolierung der Gesamt-RNS und die Synthese der cDNS erfolgten nach den Angaben der jeweiligen Hersteller. Eine gelelektrophoretische Auftrennung wurde von jedem PCR-Ansatz (15 µl) in einem 1 %-igen Gel vorgenommen.

1- 1-kb-Marker, 2- DH5; DNS zum Nachweis von *iss* (Negativ-Kontrolle), 3-IMT5155; DNS zum Nachweis von *iss* (Positiv-Kontrolle), 4- IMTp1D01; Nachweis einer DNS-freien RNS-Aufarbeitung mit *iss*-spezifischen Primern, 5- IMTp1D01; cDNS zum Nachweis der Expression von *iss*, 6- DH5; DNS zum Nachweis von *iucD* (Negativ-Kontrolle), 7- IMT5155; DNS zum Nachweis von *iucD* (Positiv-Kontrolle), 8- IMTp1D01; Nachweis einer DNS-freien RNS-Aufarbeitung mit *iucD*-spezifischen Primern, 9- IMTp1D01; cDNS zum Nachweis der Expression von *iucD*.

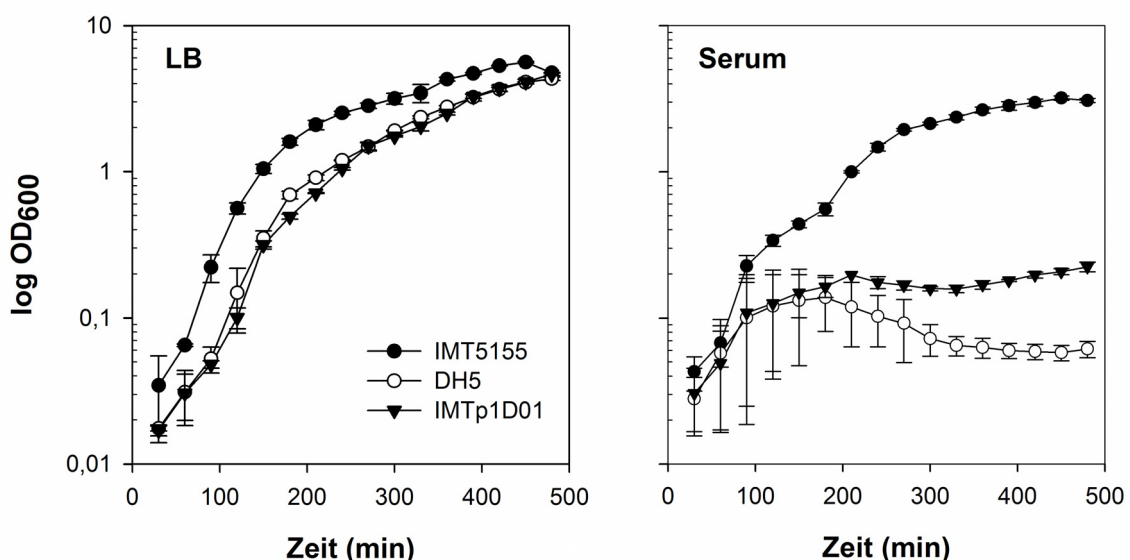
Die PCR-Ergebnisse bestätigten erneut den Übertritt des p1D01-Plasmids in DH5 und lassen zudem darauf schliessen, dass einzelne Gene des Plasmids offenbar auch hinter dem neuen genetischen Hintergrund exprimiert werden können.

## 2.5 Eigenschaften der p1D01-Transformante (IMTp1D01)

### 2.5.1 Vergleichende Wachstums-Assays verschiedener *E. coli*-Stämme in Serum

Die Mechanismen, die im Verlauf einer Immunantwort die Erkennung und Beseitigung von eingedrungenen bakteriellen Erregern in Warmblütern bewirken sind äußerst vielfältig. Neben einer zellulären besteht die humorale Immunität, die auf Antikörpern beruht und durch Transfusion von Serum übertragbar ist. Durch Bindung der Antikörper an einen bakteriellen Erreger wird das Komplementsystem aktiviert, das zusammen mit den Leukozyten (Lymphozyten und Monozyten) des Blutes an der Aufbereitung und Phagozytose von Mikroorganismen beteiligt ist. In käuflich erworbenem Serum (nicht hitzeinaktiviert) kann dieser Vorgang zwar nicht simuliert werden, aber die mit dem Serum assoziierten Eigenschaften stellen für apathogene Stämme häufig ein Wachstumsproblem dar. So zeigte der avirulente aviäre *E. coli*-Stamm Av (Wooley et al., 1992a) bereits in LB-Bouillon mit

einem Zusatz von 10 % Hühnerserum Wachstumsprobleme (Wooley et al., 1992b). Inwiefern das ColV-Plasmid p1D01 dem *E. coli* K12-Stamm DH5 eine erhöhte Tenazität im Serum vermittelt, sollte vergleichende Wachstums-Assays mit DH5 und der Transformante in LB-Medium mit 10 % Hühnerserum (Invitrogen, Lot. 4822064D) aufgezeigen. Das Wachstumsverhalten beider Stämme ergab unter diesen Bedingungen keine Unterschiede. In einem nachfolgenden Assay wurde deshalb das Wachstum pColV-positiver *E. coli*-Stämme (IMT5155, IMTp1D01) in 100 % Serum mit DH5 verglichen (siehe Abb. 21). Der Vergleich der Generationszeit des APEC-Wildtyps IMT5155 in LB ( $g = 28,56$  min) mit der im Serum ( $g = 43,08$  min) ergab eine Wachstumsverzögerung von knapp 15 min, was auf eine gute Adaptation des Stammes an die im Serum vorherrschenden Bedingungen rückschließen ließ. Die Generationszeit von IMTp1D01 hatte sich im Serum mit 1,59 h deutlich gegenüber der benötigten Zeit im LB-Medium ( $g = 30,9$  min) verlangsamt, verglichen mit der Abnahme der Zellzahl von DH5 wies IMTp1D01 jedoch ein um vier Potenzen höheres Wachstum im Serum auf (IMT5155:  $3,2 \times 10^8$ , DH5:  $1,0 \times 10^3$  und IMTp1D01:  $4,2 \times 10^7$ , siehe Tab. 12 und Tab. 13, im Anhang) und macht eine Bedeutung des Plasmids während der Pathogenese des Stammes deutlich.

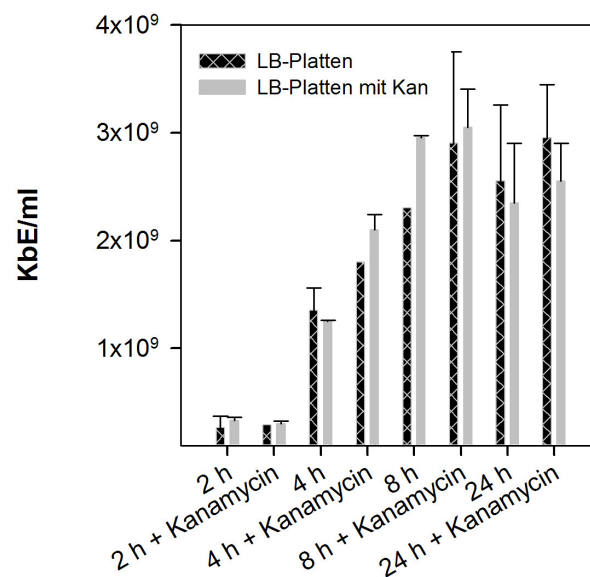


**Abb. 21 Wachstumskurve der Stämme IMT5155, DH5 und IMTp1D01 in LB-Medium und Serum.** Alle 30 min wurden von den Kulturen Aliquots entnommen und die optische Dichte (600 nm) ermittelt. Hierzu wurden die Bakterien kurz pelletiert und in einer entsprechenden Menge PBS suspendiert. Neben der Messung der optischen Dichte wurden zusätzlich alle 2 h entsprechende Verdünnungstufen auf LB-Agarplatten ausplattiert, die entsprechend dem untersuchten Stamm ohne und mit Kanamycin (50 µg/ml) supplementiert waren und deren Ergebnisse für die Berechnung der Generationszeiten verwendet wurden. Die Generationszeit jedes Stammes betrug im LB-Medium nahezu 30 min, während im Serum große Unterschiede auftraten.

Schwarzer Kreis: IMT5155, weißer Kreis: DH5, schwarzes Dreieck; IMTp1D01.

### 2.5.2 *In vitro*-Stabilitätsnachweis von p1D01 in DH5

Um die Transformante *in vitro* auf ihre Eigenschaften untersuchen zu können, musste zuvor die Stabilität des Plasmids in dem chromosomalen Hintergrund von DH5 ohne Selektionsdruck über den zu testenden Zeitraum *in vitro* überprüft werden. Um einen Vergleich zu haben, wurde derselbe Versuch parallel auch unter Einwirkung des Antiinfektivums durchgeführt (siehe Abb. 22). Den Ergebnissen zur Folge trat p1D01 auch nach 24 h ohne den Selektionsdruck von Kanamycin im LB-Medium noch stabil in DH5 auf, da zu allen untersuchten Zeitpunkten ähnliche Anzahlen „Kolonie bildender Einheiten“ (KbE/ml) auf LB-Platten mit dem Antiinfektivum nachzuweisen waren.



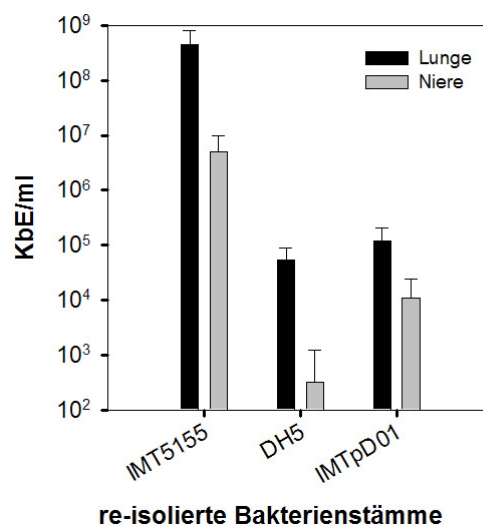
LB-Medium im Kolben mit und ohne Antiinfektivum

**Abb. 22 *In vitro*-Stabilitätstest von p1D01 in DH5 über einen Zeitraum von 24 h in LB-Medium mit und ohne Zusatz des Antiinfektivums Kanamycin.** Die Transformante wurden im Dreifachansatz über 24 h in LB-Flüssigmedium mit und ohne Antiinfektivum inkubiert, wobei Proben nach 4 h, 8 h und 24 h auf LB-Platten mit und ohne Kanamycin (50 µg/ml) ausplattiert und nach der Inkubation ausgezählt wurden.

### 2.5.3 *In vivo*-Assays mit der Transkonjugante IMTp1D01

*In vivo* wurde nach einem am Institut bereits etablierten Infektionsmodell (Antão et al., 2008) jeweils sieben Hühner der Rasse White Leghorn (fünf Wochen) mit DH5 (Negativ-Kontrolle) und der Transformante IMTp1D01 infiziert. Parallel zu diesem Versuch erfolgte ein Infektionsversuch mit dem Wildtyp IMT5155, dessen Daten zum Vergleich (als Positiv-

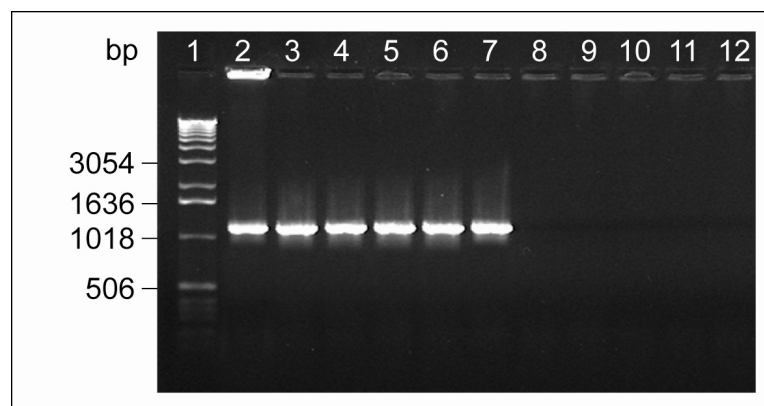
Kontrolle) mit herangezogen wurden. 24 h *post infectionem* (*p.i.*) erschienen die mit DH5 und IMTp1D01 infizierten Tiere klinisch gesund. Die Sektion der mit den *E. coli* K12-Stämmen infizierten Tiere ergab interessanterweise durchaus in beiden Versuchsgruppen makroskopisch sichtbare pathomorphologische Veränderungen, wobei die durch die Transformante hervorgerufenen Veränderungen deutlich prägnanter ausfielen (persönliche Mitteilung, Glodde, S., IMT FU-Berlin). Nachgewiesen werden konnte eine vaskuläre hämorrhagische Diathese im Epikard und den serösen Häuten sowie eine geringgradige Perikarditis und eine geringgradige pseudomembranöse Entzündung der Leberserosa. Des Weiteren trat eine beidseitige mittelgradige Pneumonie, pseudomembranöse Aerosacculitis und die Kongestion der Milz auf. Obwohl diese Organveränderungen infolge der bakteriellen Infektion nachzuweisen waren, bestätigten die Ergebnisse der re-Isolierung beider *E. coli* K12-Stämme, dass die Stämme bereits effektiv von der Immunantwort reduziert worden waren (siehe Abb. 23). 24 h *p.i.* ließ sich DH5 nur noch mit  $5,2 \times 10^4$  KbE/ml und IMTp1D01 mit  $1,2 \times 10^5$  KbE/ml aus der Lunge reisolieren. Aus Herz und Milz konnten keine Bakterien und aus der Niere nur eine sehr geringen Anzahl KbE/ml (DH5: 9,0 KbE/ml, IMTp1D01:  $4,6 \times 10^2$  KbE/ml) re-isoliert werden.



**Abb. 23 Säulendiagramm zum Vergleich der re-isolierten Bakterien (KbE/ml) aus Lunge und Niere infizierter Hühner.** Von jedem Tier wurden 24 h *p. i.* Proben von Lunge, Milz, Leber und Niere entnommen und serielle Verdünnungsstufen auf LB-Platten ohne und mit Kanamycin (50 µg/ml) ausplattiert. Jede Säule beinhaltet die Ergebnisse aller Tiere (n = 7) pro injiziertem Bakterienstamm, wobei bei den *E. coli*-K12 Stämmen keine Bakterien aus der Leber und Milz re-isoliert werden konnten, weshalb die Ergebnisse dieser Organe auch nicht für den Wildtyp IMT5155 aufgeführt wurden.

Die aus den Tieren re-isolierten DH5- und IMTp1D01-Kolonien wurden stichprobenartig auf ihre Identität überprüft. Mit einer für das Colicin V-Operon spezifischen PCR (*cvi/cvaA*) wurde das Vorhandensein bzw. Fehlen des Plasmids überprüft (siehe Abb. 24). Die durch die *E. coli* K12-Stämme hervorgerufenen Entzündungserscheinungen unterscheiden sich dennoch wesentlich von denen des APEC-Wildtyps IMT5155. Bereits drei Stunden nach Applikation des Stammes zeigten sich bei den infizierten Hühnern klinische Symptome einer schweren Allgemeinerkrankung, die sich auch durch den Nachweis von ca.  $10^3$  KbE/g Bakterien aus Herz, Leber, Milz und Niere bestätigen ließen. 48 h *p. i.* zeigten die inneren Organe von 85 % der infizierten Tiere eine stark entzündliche und septikämische Genese auf, aus denen  $10^6$ - $10^7$  KbE/g Bakterien re-isolieren werden konnten.

Die hohe Anzahl Bakterien im Blut und in den Organen führt zu Funktionsstörungen einzelner Organe bzw. einem akuten Organversagen, die im Rahmen eines septikämischen Schockgeschehens letztendlich den Tod der Tiere hervorrufen würden.



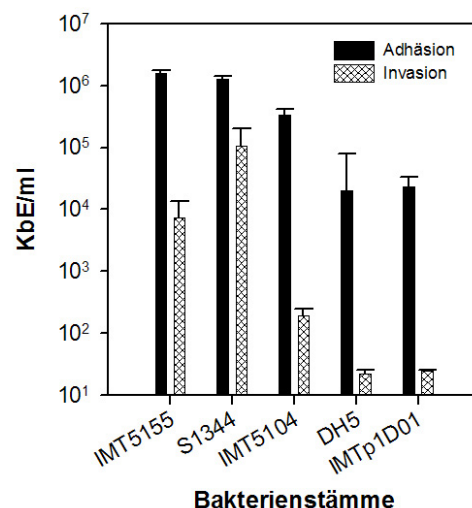
**Abb. 24 Elektropherogramm des PCR-Nachweises von ColV-Plasmiden der re-isolierten Bakterienstämme aus der Lunge und Niere infizierter Hühner.** Ausgehend von den seriell ausgebrachten Bakterien-Verdünnungen der homogenisierten Lunge und Niere wurden jeweils Kolonien vom Agar gepickt und in einer ColV-spezifischen PCR (*cvi/cvaA*; 1180 bp) überprüft. 1- 1-kb-Marker, 2- IMT5155 (Positiv-Kontrolle), 3- IMTpD01 (Positiv-Kontrolle), 4-5 IMTpD01; re-isoliert aus der Lunge, 6-7 IMTpD01; re-isoliert aus der Niere, 8- DH5 (Negativ-Kontrolle), 9-10 DH5; re-isoliert aus der Lunge, 11-12 DH5; re-isoliert aus der Niere

## 2.6 Zellkulturversuche mit IMTp1D01

### 2.6.1 Adhäsions- und Invasions-Assays mit aviären Fibroblasten

Die Etablierung einer Infektion wird wesentlich durch die Fähigkeit von Pathogenen bestimmt, an spezifische Zellen des Wirtes zu adhären. ColV-Plasmide weisen neben einer faktorunabhängige Hydrophobizität (Waters & Crosa, 1991) die genetische Information des Temperatursensitiven Hämagglutinis (*tsh*) auf, das offenbar als afimbrielles Adhäsinn wirkt

(Dozois, 2000). Neben einer Adhäsivität wurde auch bereits die durch ein konjugatives, Colicin-codierendes Plasmid vermittelte gesteigerte Invasivität eines APEC-Isolates beschrieben (Stehling et al., 2003). Inwiefern p1ColV<sub>5155</sub> für die Adhäsion/Invasion des APEC-Wildtyps IMT5155 an das aviäre Lungenepithel von Bedeutung sein könnte, wurde in Assays mit der Kanamycin-selektionierbaren Mutante des Plasmids p1D01 in DH5 (IMTp1D01) und aviären Fibroblasten (CEC-32) untersucht. Als Positiv-Kontrollen wurde neben IMT5155 ein invasiver *S. enterica ssp. enterica* Serovar Typhimurium-Stamm (S1344) mitgeführt. Als Negativ-Kontrolle wurde neben dem *E. coli* K12-Stamm DH5 auch ein apathogener *E. coli*-Stamm aviären Ursprungs (IMT5104) eingesetzt. Im Assay zeigten sich zwischen den pathogenen und apathogenen Stämmen Unterschiede in der Adhäsion, die jedoch mit zwei Potenzen nicht besonders signifikant ausfielen. Zwischen DH5 und der Transformante trat kein Adhärenz-Unterschied auf (siehe Abb. 25). Im Invasions-Assay konnte die Invasivität des *S. enterica ssp. Enterica* Serovar Thyphimurium-Stammes S1344 und des APEC IMT5155 bestätigt werden. In vergleichsweise deutlich geringerem Maße konnte der aviäre Stamm IMT5104 in den CEC-32-Zellen nachgewiesen werden, obwohl die Bakterien dieses Stammes im Vergleich zu beiden *E. coli* K12-Stämmen deutlich häufiger in den Fibroblasten auftraten. DH5 und die Transformante zeigten auch hier keine signifikanten Unterschiede zueinander, womit eine plasmidvermittelte Adhäsion/Invasion auf diese Art und Weise nicht nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 25).

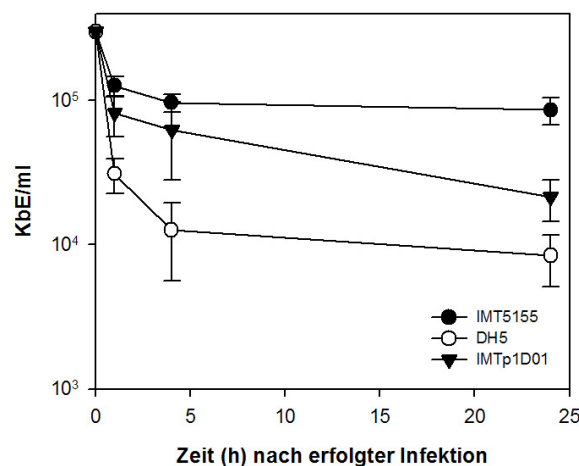


**Abb. 25 Säulendiagramm zum Vergleich des Adhäsions- und Invasionsverhaltens verschiedener pathogener und apathogener Stämme der *Enterobacteriaceae*.** Bei diesem Versuch wurden die Fibroblasten jeweils mit einer MOI 20 ( $7,5 \times 10^4$  Zellen/Vertiefung) pro Bakterienstamm infiziert. Die Infektion der CEC-32-Zellen erfolgte ausgehend von der jeweiligen Bakterienkultur mit dreifacher Wiederholung. Insgesamt wurde der Versuch pro eingesetzten Bakterienstamm ebenfalls drei Mal wiederholt. Verglichen wurde DH5 (Negativ-Kontrolle) mit der Transformante IMTp1D01, sowie dem APEC-Stamm IMT5155, dem apathogenen aviären Stamm IMT5104 und dem invasiv pathogenen Stamm *S. enterica ssp. enterica* Typhimurium (S1344; Positiv-Kontrolle).



## 2.6.2 Makrophagen-Assay

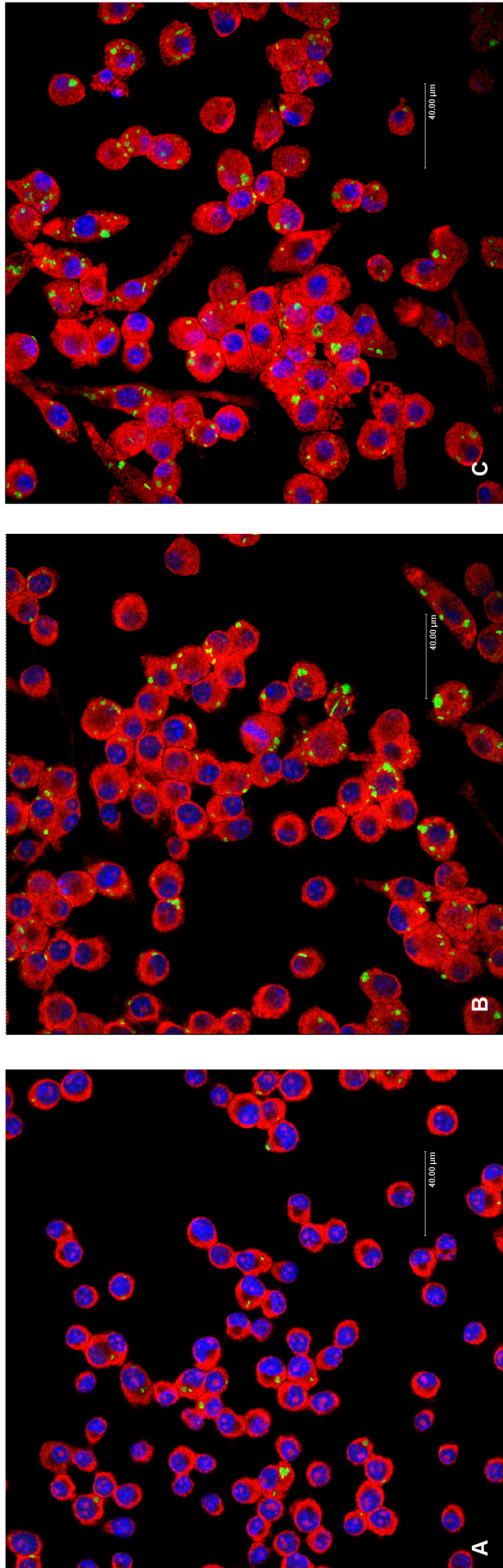
Das Krankheitsbild der Colibakteriose beinhaltet einen septikämischen Verlauf der Infektion, bei dem sich die Bakterien mit dem im Blut und in der Lymphflüssigkeit enthaltenen Zellen der spezifischen und unspezifischen Immunantwort auseinandersetzen müssen (Jeffrey et al., 2002; Dho-Moulin & Fairbrother, 1999). Makrophagen sind in der Lage, Bakterien vollständig aufzunehmen, mittels bakterizider Substanzen abzutöten und zu lysieren. Bei diesem Vorgang wird das eingedrungene Bakterium zunächst phagozytiert und ins Zellinnere des Makrophagen abgeschnúrt, wo es mit granulären Einschlüssen, den sogenannten Lysosomen, verschmilzt. Die Lysosomen enthalten verschiedene Substanzen, wie z. B. Wasserstoffperoxid, Lysozym, Proteasen, Phosphatasen, Nukleasen und Lipasen zur wirksamen Abtötung des Bakteriums (Darken & Savage, 1987). Infektionsversuche mit IMT5155 und den Maus-Makrophagen J774 hatten gezeigt, dass der APEC-Stamm nach anfänglicher Reduktion der Zellzahl über 24 h mit ähnlich hohen Keimzahlen re-isoliert werden konnte. Dies spricht dafür, dass dieser Stamm in der Lage ist, den bakteriziden Eigenschaften der Makrophagen zu widerstehen. Welche Rolle das ColV-Plasmid für die Überlebensfähigkeit in den Makrophagen spielt, sollte in einem Assay mit der Transformante IMTp1D01 und den Makrophagenzellen J774 untersucht werden (siehe Abb. 26).



**Abb. 26 Grafische Darstellung der Untersuchungsergebnisse zur Bedeutung von p1D01 für die Persistenz des APEC-Stammes in den Makrophagen J774 über einen Zeitraum von 24 h.** Die Makrophagen ( $3,0 \times 10^4$  Zellen/Vertiefung) wurden jeweils mit einer MOI 10 mit den Bakterienstämmen IMTp1D01, DH5 (Negativ-Kontrolle) und IMT5155 (Positiv-Kontrolle) infiziert. Direkt nach der Infektion, 30 min, 1 h, 4 h und 24 h *p. i.* erfolgte die Lysis der Makrophagen mit Triton X und eine serielle Verdünnung auf Agarplatten mit und ohne Antiinfektivum. Pro Stamm wurden drei Versuchsansätze mit drei Wiederholungen ausgewertet.

Der Invasions-Assay ergab, dass die Makrophagen pathogene und apathogene Stämme 30 min nach der Infektion in gleichem Umfang aufgenommen hatten. 1 h, 4 h und 24 h später wurde deutlich, dass eine erhöhte Überlebensrate der Bakterien offenbar an die Präsenz des ColV-Plasmids gekoppelt ist (siehe Abb. 26). In den ersten vier Stunden war eine Reduktion aller Stämme nachzuweisen, deren Ausmaß von dem eingesetzten Bakterienstamm abhing. Während IMT5155 nach anfänglicher Absterberate zwischen 4 h ( $9,7 \times 10^4$  KbE/ml) bis 24 h ( $8,6 \times 10^4$  KbE/ml) *p.i.* mit einer stabilen Keimzahl nachzuweisen war, erfolgte bei dem *E. coli* K12-Stamm DH5 über diesen Zeitraum eine Reduktion um eine weitere Potenz ( $8,4 \times 10^3$  KbE/ml). Im Vergleich zu DH5 wies die ColV-Transformante IMTp1D01 eine höhere Tenazität in den Makrophagen auf, die 24 h *p.i.* noch mit  $3,9 \times 10^4$  KbE/ml nachzuweisen waren.

Durch Anwendung des FISH-Verfahrens mit nachfolgender konfokalen Laserscanning Mikroskopie konnte das Ergebnis bestätigt werden. Die RNS-DNS-Hybridisierung mit verschiedenfarbig gelabelten RNS-Primern für die eu- und prokaryotische ribosomales DNS ließ deutlich erkennen, dass die Transformante nach 24 h Inkubation eine höhere Überlebensrate in den Makrophagen aufwies als DH5. Da die Methode der RNS-DNS-Hybridisierung eng an die Synthese von rRNS und ribosomalen Proteinen gekoppelt ist, ist damit der Nachweis lebender, sich proliferierender *E. coli* gewährleistet (siehe Abb. 27).



**Abb. 27 Bilder der Laserscanning-Mikroskopie nach Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung infizierter Makrophagen (J774);** (Nordhoff, M., IMT FU Berlin, FB Veterinärmedizin). Die Anzucht der Makrophagen erfolgte auf Deckgläschen bis zu einer Dichte von  $3,5 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup>, bevor sie mit den unterschiedlichen Bakterienstämmen infiziert wurden (MOI 10). Nach 24 h Inkubation wurden die Zellen mit Formaldehyd fixiert und nachfolgend mit farbig gelabelten Sonden gegen eu- und prokaryotische ribosomale DNS hybridisiert. Die mit Indocarbocyanin markierte eukaryotische 18SrNS-Sonde (EUK516) lässt den Zellkern der Makrophagen blau, die mit Cybergreen markierte universelle DNS hybridisiert. Zur besseren Orientierung erfolgte die Färbung des eukaryotischen Zellskeletts mit dem roten DNS-Farbstoff TOP-PRO-3. (A) Makrophagenzellen infiziert mit DH5, (B) mit IMT5155 und (C) mit IMTp1D01

## 2.7 Untersuchungen zur Lokalisation der Promotoren von *tsh* und *iss*

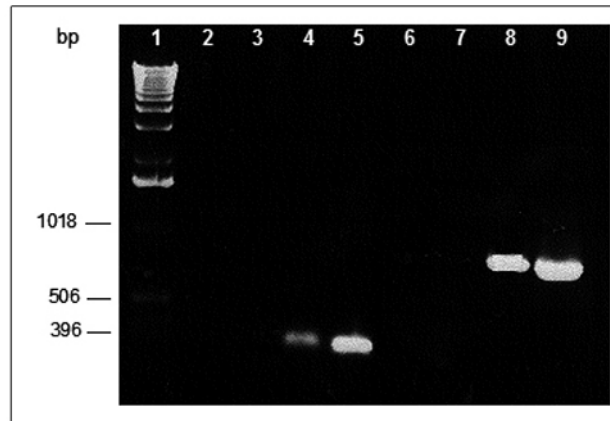
Die Verbreitung der APEC erfolgt nach derzeitiger Auffassung über bakteriell kontaminierten Kot, verunreinigtes Futter oder Trinkwasser sowie durch Einatmen erregerehaltigen Staubes (Dho-Moulin & Fairbrother, 1999). Die Persistenz in der Umwelt setzt die Expression anderer Proteine voraus als die der erfolgreichen Infektion eines Wirtes. Die Wahrnehmung der Bakterienzellen von unterschiedlichen Umweltsignalen, beeinflusst auch die Expression von virulenzassoziierten Genen des *E. coli*-Chromosoms und der Plasmide, die koordiniert reguliert werden.

Die Bedeutung der Verfügbarkeit von Eisenionen für die Regulation der Eisenaufnahmesysteme Aerobaktin, Salmochelin und dem Colicin V-Operon wurde bereits für andere Stämme beschrieben und konnte auch für die plasmidcodierten Eisentransportsysteme (Aerobaktin und SitABCD) von IMT5155 durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt werden (siehe Abschnitt 2.4.1). Bei ausreichender Versorgung von *E. coli* mit dem Übergangsmetall, fungieren  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen als Co-Repressor und blockieren im Komplex mit Fur die Transkription eisenregulierter Gene. Die Inaktivierung des Komplementsystems im Serum durch Iss (Nolan et al., 2003; Binns et al., 1982), sowie die effiziente Adhärenz des Tsh über die Tsh<sub>s</sub>-Domäne an Erythrozyten, speziell an das Hämoglobin (Kostakioti & Stathopoulos, 2004), sind an den Übergang des pathogenen Bakteriums in den eukaryotischen Blutkreislauf gekoppelt. Eisenbindende Proteine der höheren Wirbeltiere halten bei neutralem pH-Wert die freie Eisenkonzentration des Blutes so gering ( $10^{-6}$  M), dass dieser Mangel als regulatorisches Signal direkt oder indirekt auf die Expression der virulenzassoziierten Gene *iss* und *tsh* des p1ColV<sub>5155</sub>-Plasmids Einfluss nehmen könnte, was in einer Reihe von unterschiedlichen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätsassays überprüft wurde.

### 2.7.1 Nachweis der Transkription von *tsh* und *iss*

Für den Nachweis der Transkriptionsstartpunkte von *tsh* und *iss* mit Hilfe der 5'-RACE („rapid amplification of cDNA-5'-ends“, Life Technologies) wurde genspezifische mRNA benötigt. Der Expressionsnachweis der virulenzassoziierten Faktoren erfolgte zunächst unter den im Labor herkömmlicherweise genutzten Anzuchtbedingungen von IMT5155 (LB-Medium, 37 °C, 200 rpm). Die bakterielle Gesamt-RNS wurde mittels „SV Total RNA Isolation System“ (Promega) isoliert und Aliquots für eine reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) eingesetzt. Bei der RT-PCR wurde die mRNA mit einer RNS-abhängigen DNS-Polymerase (M-MLV RT; Promega), unter Verwendung der sogenannten

„Random Primers“ (Promega) zunächst in cDNS umgeschrieben und dann mit *tsh*- und *iss*-spezifischen Primern amplifiziert. Unter den gewählten Anzuchtbedingungen gelang der indirekte Nachweis von *tsh*- und *iss*-spezifischer mRNA (siehe Abb. 28).

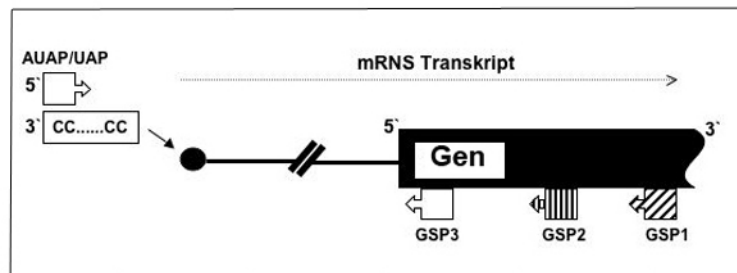


**Abb. 28 Elektropherogramm des Transkriptionsnachweises von *iss* und *tsh* mittels RT- und genspezifischer PCR.** Für die Durchführung einer RT-PCR wird 1 µg Gesamt-RNS benötigt, die zunächst nach Anleitung des Herstellers in cDNS umgeschrieben wird. Mögliche kontaminierende DNS wird in einem speziellen Aufreinigungsschritt durch einen DNaseI-Verdau beseitigt. Der Erfolg dieses Schrittes wurde überprüft, bevor die mRNA in cDNS umgeschrieben, und mit spezifischen Primern der Nachweis der Transkription von *tsh* (823 bp) und *iss* (309 bp) erfolgte. 1- 1 kb-Marker, 2- Wasser (Negativ-Kontrolle), 3- RNS nach DNase-Verdau [*iss* cdsfw/*iss* cdsrv], 4- cDNS [*iss* cdsfw/*iss* cdsrv], 5- gepickte Kolonie von IMT5155 [*iss* cdsfw/*iss* cdsrv], 6- Wasser (Negativ-Kontrolle), 7- RNS nach DNase-Verdau [*tsh*<sub>(132)</sub>/*tsh*<sub>(955)</sub>], 8- cDNS [*tsh*<sub>(132)</sub>/*tsh*<sub>(955)</sub>], 9- gepickte Kolonie von IMT5155 [*tsh*<sub>(132)</sub>/*tsh*<sub>(955)</sub>]

Für die Untersuchungen der Transkriptionsstartpunkte beider Gene mit Hilfe der 5'-RACE erfolgte die Anzucht von IMT5155 unter denselben Bedingungen mit anschließender Gewinnung hochreiner RNS mittels CsCl-Dichte-Gradientenzentrifugation.

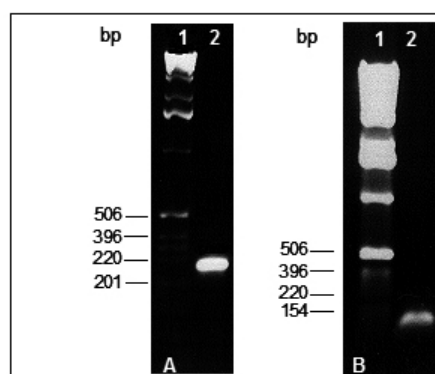
### 2.7.2 5'-RACE-PCR zur Lokalisation der Promotoren von *tsh* und *iss*

Die 5'-RACE bietet die Möglichkeit den Abschnitt zwischen einer bekannten C'-terminalen Gensequenz und dem unbekannten 5'-flankierenden Bereich des Gens über mehrere aufeinanderfolgende nested PCRs zu identifizieren (Frohman et al., 1988). Sowohl *tsh* als auch *iss* wurden infolge der Sequenzanalyse von p1ColV<sub>5155</sub> nachgewiesen und liegen offenbar mit einer Kopie pro Zelle vor (siehe Abschnitt 2.2.5). Entsprechende Gene wurden auch auf dem Plasmid pAPEC-O2-ColV [Acc. NC\_007675] sequenzanalysiert, so dass ausgehend von dieser DNS-Sequenz die benötigten drei spezifischen Primer sowohl für *tsh* als auch *iss* generiert werden konnten (siehe Abb. 29).



**Abb. 29** Schematische Übersicht der in der 5'-RACE eingesetzten genspezifischen (GSP1-3) und unspezifischen Oligonukleotid-Primer (Abridged Anchor und AUAP/UAP-Primer).

Mit Hilfe des ersten genspezifischen Primers (GSP1) und einer RNS-abhängigen DNS-Polymerase (M-MLV RT, RNase H-) erfolgte zunächst ein Umschreiben der isolierten mRNA in cDNS. Die cDNS enthält nun neben einem Teil des Gens die stromaufwärts vom Translationsstartpunkt gelegene Sequenz bis hin zum Promotor. Damit diese Sequenz durch nachfolgende PCRs vollständig amplifiziert werden kann, wird an das 3'-Ende der einzelsträngigen cDNS mit Hilfe einer terminalen Deoxynukleotidyl-Transferase (TdT) und dCTP's ein Poly-C-Schwanz angehängt. Dieser Poly-dC-Schwanz dient als Adaptor für einen vorwärts gerichteten Primer (Abridged-Anker-Primer). Mit Hilfe eines zweiten, rückwärts gerichteten genspezifischen Primers (GSP2) kann das Gen mit der 5'-vorgelagerten Sequenz amplifiziert werden. Zum gelelektrophoretischen Nachweis des spezifischen Produktes muss die Konzentration häufig durch eine weitere nested PCR mit einem weiteren Universal- und einem dritten genspezifischen Primer (GSP3) erhöht werden. Auf diese Art und Weise ist es gelungen für *tsh* ein Amplifikat mit etwa 220 bp und für *iss* mit etwa 100 bp zu amplifizieren (siehe Abb. 30).

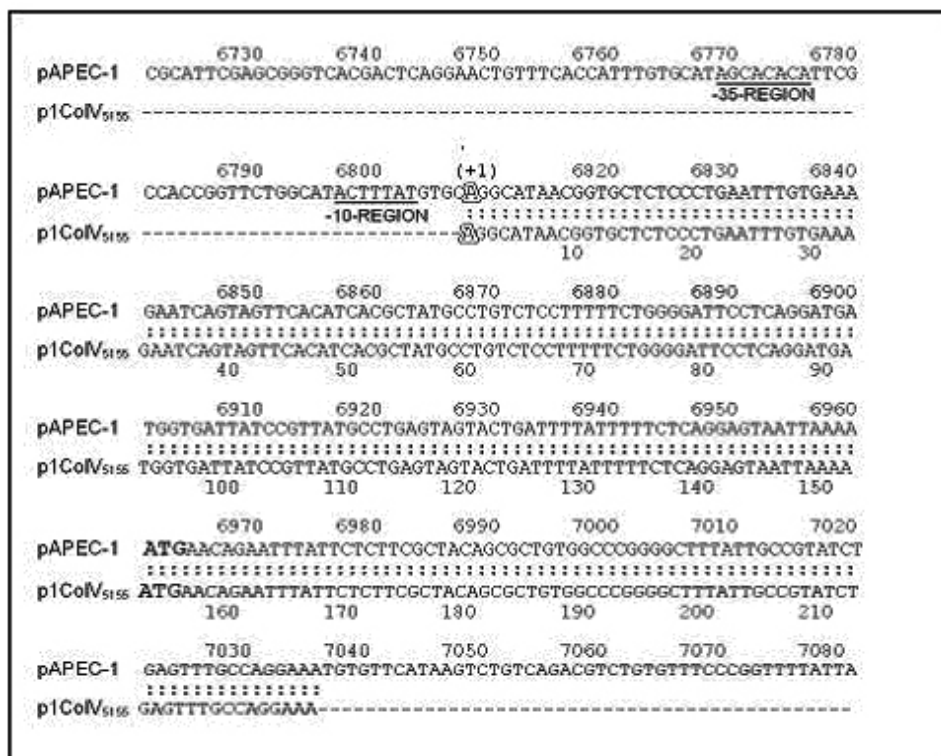


**Abb. 30** Elektropherogramme der RACE-PCR-Produkte von *tsh* und *iss*. Für den Nachweis beider Amplifikate wurden jeweils die Höchstmenge an gereinigter cDNS, dC-DNS und Verdünnung des ersten PCR-Produktes eingesetzt und 35 Zyklen der jeweiligen PCR gewählt. Die Auftrennung der kleinen Amplifikate erfolgte in einem 1,5%-igem Gel bei 70 V für 1,5 h.

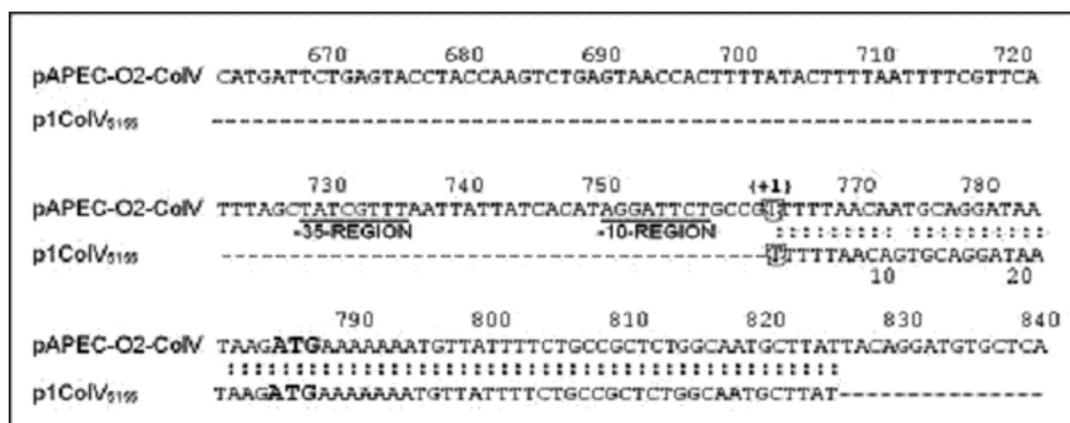
(A)- Nachweis des RACE-PCR-Produktes ausgehend von *tsh*; 1- 1 kb Marker; 2- RACE-Amplifikat von *tsh*, (B)- Nachweis des RACE-PCR-Produktes ausgehend von *iss*, 1- 1 kb Marker, 2- RACE-Amplifikat von *iss*.

### 2.7.3 Sequenzanalyse der RACE-PCR-Produkte

Für die eindeutige Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte beider Gene mussten die amplifizierten Regionen stromaufwärts vom *tsh* und *iss* sequenzanalysiert werden. Zu diesem Zweck wurden die Amplifikate der nested RACE-PCR aus dem Gel eluiert und nach Anleitung des Herstellers in den pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO-Cloning Vektor (Invitrogen) ligiert. In einem nachfolgenden Elektroporationsschritt wurde der jeweilige rekombinante Klonierungsvektor in TOP 10-Zellen transformiert. Pro Gen wurden drei Transformanten zur Sequenzanalyse der rekombinanten Vektoren eingeschickt. Danach erfolgte ein Abgleich der stromaufwärts gelegenen genspezifischen Sequenzen miteinander durch multiples Sequenzalignment (Lasergene 2000; DNASTar, USA). Diese ergaben für *tsh* und *iss* in allen drei Fällen jeweils eine identische Nukleotidabfolge. Durch den Sequenzabgleich mit dem 5'-flankierenden Bereich des *tsh*-Gens von pAPEC-O2-ColV [Acc. NC\_007675] konnte der Transkriptionsstartpunkt des *tsh* 165 bp vom Translationsstartpunkt entfernt identifiziert werden (siehe Abb. 31), während der Abgleich für *iss* eine Entfernung von 24 bp ergab (siehe Abb. 32). Ausgehend von den Transkriptionsstartpunkten (*tsh*: CAG und *iss*: GTT) wurden die Promotorbereiche bestimmt und mit Hilfe eines Promotor-Suchprogramms verifiziert.



**Abb. 31 Alignment der ermittelten 5'-Region von *tsh* und Darstellung des identifizierten Promotorbereichs.** Die (-)35-Region des Promotors ist ebenso wie die AT-reiche (-)10-Region unterstrichen, der Transkriptionsstartpunkt ist umrandet und mit (+1) gekennzeichnet, während der Translationsstartpunkt (ATG) größer und fett dargestellt wurde.

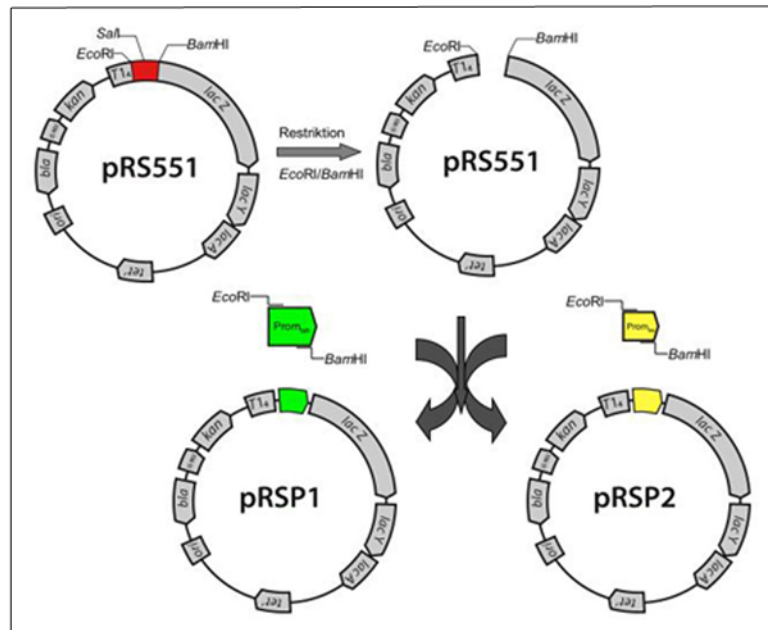


**Abb. 32 Alignment der ermittelten 5'-Region von *iss* und Darstellung des identifizierten Promotorbereichs.** Die (-)35-Region des Promotors ist ebenso wie die AT-reiche (-)10-Region unterstrichen, der Transkriptionsstartpunkt ist umrandet und mit (+1) gekennzeichnet, während der Translationsstartpunkt (ATG) größer und fett dargestellt wurde.

## 2.7.4 Ligation der Promotoren in den Expressionsvektor pRS551

Um die Aktivität der identifizierten Promotoren überprüfen zu können, sollten entsprechende Sequenzabschnitte in einen  $\beta$ -Galaktosidase-Expressionsvektor kloniert werden. Die Abschnitte enthielten jeweils die Sequenz ab dem Transkriptionsstartpunkt des Gens plus 36 bp Promotorsequenz für *iss* und 39 bp für *tsh*. Da DNS-Abschnitte stromaufwärts des Promotors die Effizienz der Transkription beeinflussen können, erfolgte die Auswahl der *EcoRI*-Primer bei *iss* weitere 87 bp und bei *tsh* weitere 84 bp vom Promotor entfernt. Bei dem  $\beta$ -Galaktosidase-Expressionsvektor pRS551 handelt es sich um einen Multicopyvektor, der keine Promotorsequenz für die Strukturgene des Laktose (*lac*)-Operons besitzt. Er zeichnet sich demzufolge durch eine geringe Hintergrundexpression des *lac*-Operons, sowie durch Resistenzen gegen verschiedene Antiinfektiva ( $\text{Kan}^R$ ,  $\text{Amp}^R$ ) aus. Für eine gerichtete Klonierung der Promotorregionen gibt es einen *EcoRI*-*SmaI*-*BamHI*-Polylinker zwischen dem Terminator T14 und dem *lacZ*-Gen (Simons et al., 1987). Die ermittelten Promotorbereiche für *tsh* und *iss* wurden durch spezifische Oligonukleotid-Primer mit angehängten *EcoRI*- (5'-Ende) und *BamHI*- (3'-Ende) Schnittstellen amplifiziert und in den  $\beta$ -Glaktosidase-Expressionsvektor pRS551 ligiert. In den resultierenden rekombinanten pRS551-Vektoren pP1 (mit der Promotorsequenz von *tsh*, P1 - grün) und pP2 (mit der Promotorsequenz von *iss*, P2 - gelb) befinden sich die Promotorsequenzen in Transkriptionsrichtung der *lac*-Strukturgene (siehe Abb. 33).

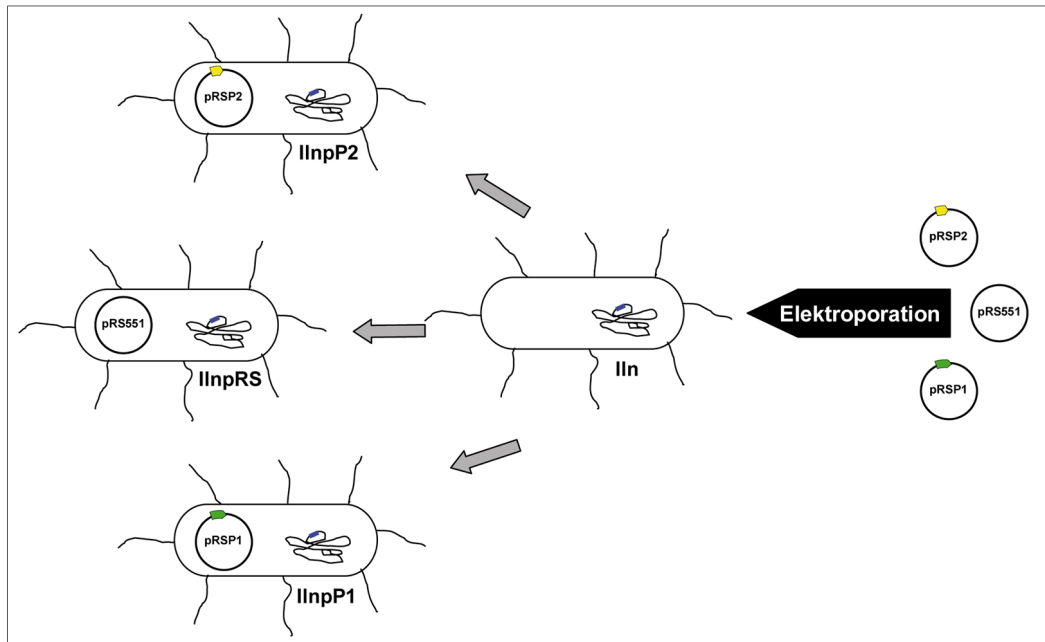




**Abb. 33 Schematische Darstellung der Ligation der Promotorbereiche von *tsh* und *iss* in den Expressionsvektor pRS551.** Auf dem Reporterplasmid pRS551 liegen die Gene folgender Strukturproteine  $\beta$ -Galaktosidase (*lacZ*), Permease (*lacY*) und Transacetylase (*lacA*), Promotor (*tet*), Transkriptionsstartpunkt (*ori*),  $\beta$ -Laktamase (*bla*), Insertionselement (IS903), Kanamycin Resistenzgen (*kan*) und der Transkriptionsterminator (*Tl<sub>4</sub>*) vor. Vor das Strukturgen der  $\beta$ -Galaktosidase kann ein variabler Promotor ligiert werden, der die Expression des nachgeschalteten  $\beta$ -Galaktosidaseproteins beeinflusst.

Zum Nachweis der erfolgreichen Klonierung wurden die rekombinanten Plasmide sowohl *EcoRI/BamHI* restringiert als auch sequenzanalysiert.

Als Rezipient für die Expressionsvektoren wurde die *lac*-negative Mutante des APEC-Stammes IMT5155 (Iln; IMT5155*lacZ*::Cm) verwendet (Li, G.W.; IMT FU-Berlin, siehe Abb. 34).



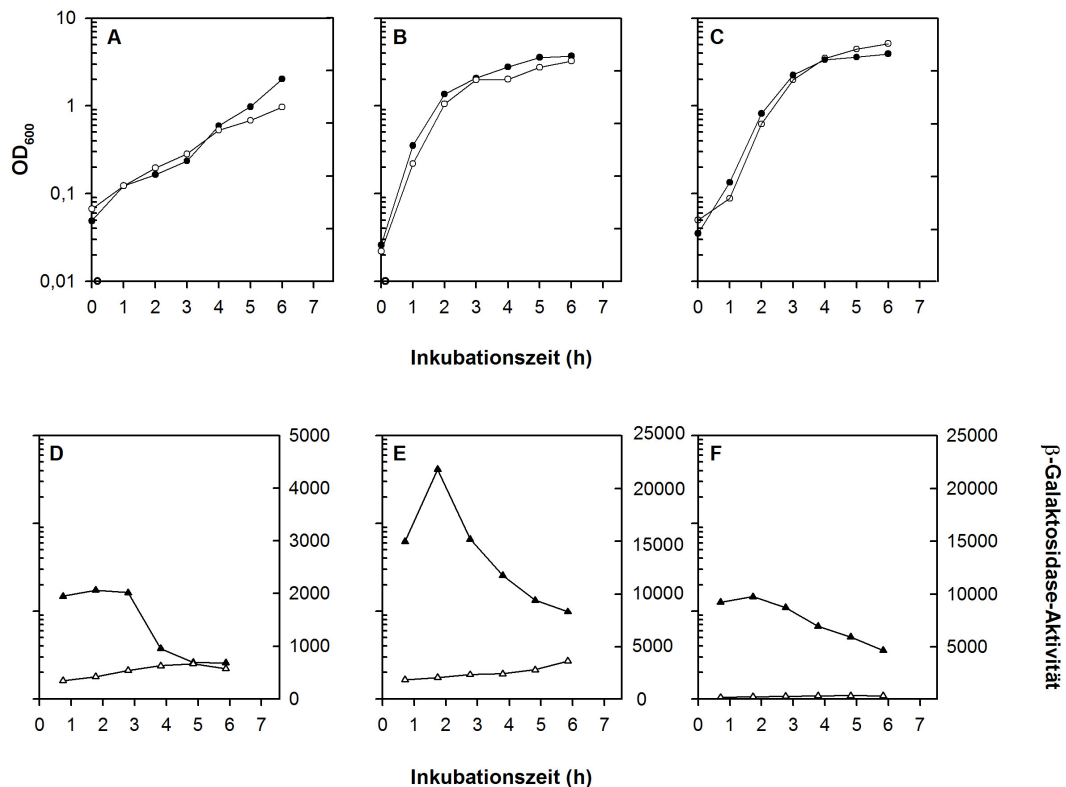
**Abb. 34 Schematische Darstellung der Elektroporation der transformierten Expressionsvektoren in die *lacZ*-deletierte Mutante des Stammes IMT5155 (Iln; IMT5155*lacZ*::Cm).** Neben den transformierten Vektoren (*tsh*-Promotor: IlnpP1; *iss*-Promotor: IlnpP2) wurde auch ein promotorloser Vektor (pRS551) als Negativ-Kontrolle elektrochemisch in den deletierten APEC-Stamm überführt.

## 2.8 Regulationsstudien der Promotoren von *tsh* und *iss*

Für die  $\beta$ -Galaktosidase-Assays wurden Einzelkolonien über Nacht in unterschiedlichen Flüssigmedien unter Zusatz von Kanamycin (50  $\mu\text{g/ml}$ ) angezogen. Aus den Übernackturen wurden erneut Vorkulturen angeimpft, die ab einer  $\text{OD}_{600}$  1 als Inokulum für die Hauptkulturen dienten. Auf diese Art und Weise konnte verhindert werden, dass Bakterienzellen aus der stationären Wachstumsphase, in denen sich die  $\beta$ -Galaktosidase bereits angehäuft hat, das Ergebnis verfälschen. Insgesamt wurden die Konstrukte im Doppelansatz mit dreimaliger Wiederholung getestet. Da die Ergebnisse jedes Ansatzes von den spezifischen Versuchsbedingungen des Tages (Kohlenhydratquelle des eingesetzten Mediums, Temperaturschwankungen, Wachstumsstadium der Bakterienkultur etc.) abhängig waren, konnten die Ergebnisse nicht wie üblich zusammengefasst und die Standardabweichung berechnet werden. Ausschlaggebend für die Darstellung der Ergebnisse war, das gleiche Aktivitätsverhalten des getesteten Promotors unter den jeweiligen Anzuchtbedingungen.

### 2.8.1 Regulatorischer Effekt von Komplex- und Minimalmedien

Durch Signaltransduktionsvorgänge sind Mikroorganismen in der Lage Veränderungen in ihrem Habitat wahrzunehmen und sich durch Umstellungen der Genexpression in ihrem Stoffwechsel darauf einzustellen. Tryptisch abgebaute Proteine sind ein wesentlicher Bestandteil von Komplexmedien und stellen große Mengen der wichtigsten Elemente (Kohlen-, Wasser-, Sauer- und Stickstoff) für das bakterielle Wachstum zur Verfügung. LB (Lysogeny Broth)- und TSB (Tryptic Soy Broth)-Medium bieten pathogenen Bakterien gute Wachstumsbedingungen, ähnlich denen in einem Wirtshabitat, während Mangelmedien wie z. B. M9 eher den Bedingungen außerhalb eines Wirtes gleichzusetzen sind. Das Wachstum im Mangelmedium bedingt die bakterielle Synthese einer Reihe lebenswichtiger Aminosäuren und Proteine, was ihre Generationszeit i. d. R. deutlich verlangsamt. So ergab sich für den Wildtyp in diesem Medium eine Generationszeit von 1,2 h, die bei den beiden Transformaten *IlnpP1* und *IlnpP2* allerdings mit etwa 2,9 h noch einmal deutlich langsamer war (siehe Abb. 35). Es kann aus diesem Grund nicht ganz ausgeschlossen werden, dass die Mutation im chromosomal codierten *LacZ* des Stammes IMT5155 umfassendere Auswirkungen auf den Stoffwechsel genommen hat. Die Aktivität der Promotoren wurde in den verschiedenen Nährbouillons bei 37 °C Wachstumstemperatur ermittelt. Die Aktivität des *iss*-Promotors von *IlnpP2* lag im M9-Medium bei etwa 2.018 Units/ml und stieg im LB-Medium bei gleicher Wachstumstemperatur auf über 21.000 Units/ml an. Das Wachstum in dem noch nährstoffreicheren TSB-Medium ergab keine weitere Steigerung, sondern einen Aktivitätsverlust (9.766 Units/ml) im Vergleich zur LB-Medium. Der *tsh*-Promotor von *IlnpP1* wies in allen drei verwendeten Medien (M9: 670 Units/ml; LB: 3.669 Units/ml, TSB: 407 Units/ml) eine zum *iss*-Promotor vergleichsweise sehr viel geringere Aktivität auf, wobei beide Promotoren die höchste Aktivität im LB-Medium aufzeigten. Interessanterweise wiesen auch beide Promotoren einen Aktivitätsverlust im TSB-Medium auf, was jedoch unterschiedliche regulatorische Rückschlüsse ermöglicht. Während der *tsh*-Promotor in TSB-Medium eine deutlich niedrigere Aktivität als im M9 Minimal-Medium aufwies, war die Aktivität des *iss*-Promotors grundsätzlich im TSB-Medium höher als im M9-Medium. Diese Ergebnisse könnten in der Bedeutung der Proteine in den unterschiedlichen ökologischen Nischen (Blut und Lungenepithel) des Wirtes begründet sein.

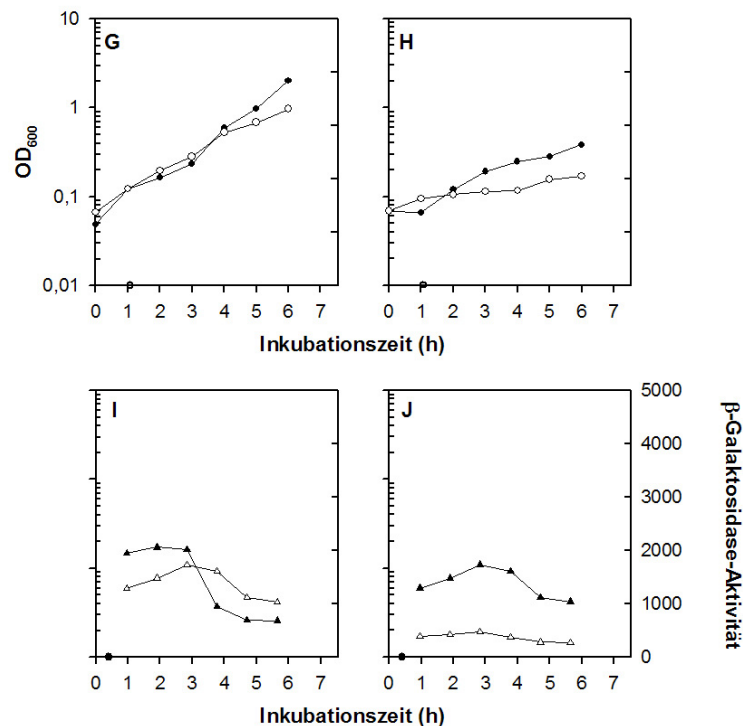


**Abb. 35 Grafische Darstellung des Wachstums der Transformanten in Mangel- und Komplexmedien und den Ergebnissen der  $\beta$ -Galaktosidase-Expression unter diesen Bedingungen.** Die Transformanten IlnpP1 (schwarzer Kreis) und IlnpP2 (weißer Kreis) wurden in flüssigen M9- (A) und Komplex-Medien LB (B) und TSB (C) angezogen. Stündlich wurden Aliquots zur Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Expression entnommen, über die ein Vergleich der Promotoraktivität von *iss* (schwarzes Dreieck) und *tsh* (weißes Dreieck) unter den jeweiligen Inkubationsbedingungen möglich wurde [M9; (D), LB; (E), TSB; (F)].

## 2.8.2 Regulatorischer Effekt von Hämoglobin

Das aviäre Temperatursensitive Hämagglutinin (Tsh) ist ein Autotransporter mit großer Homologie zu dem Autotransporter Hbp des humanpathogenen *E. coli*-Stammes EB1. Hbp ist in der Lage Hämoglobin abzubauen und die Häm-Komponente zu binden (Otto et al., 1998). Für Tsh konnte ebenfalls ein bindender und hämagglutinierender Phänotyp nachgewiesen werden (Stathopoulos et al., 1999; Provence & Curtiss, 1994). Welche regulatorische Bedeutung dem Hämoglobin zukommt, wurde in einem  $\beta$ -Galaktosidase-Assay untersucht, bei dem die transformierten Stämme IlnpP1 und IlnpP2 in M9-Medium mit und ohne Zusatz von 0,2 g/100 ml Hämoglobin angezogen wurden. Es ist bekannt, dass durch den Zusatz des Hämoglobins das Medium bakterizide Eigenschaften aufweist, durch die das Wachstum der Transformanten auch wesentlich beeinträchtigt wurde (IlnpP1: OD<sub>600</sub> 0,170; IlnpP2: OD<sub>600</sub>;

0,382, siehe Abb. 36). Der durch das Hämoglobin verursachte Wachstumsstress, könnte in Kombination mit einer verstärkten Promotoraktivität der virulenzassoziierten Gene einhergehen. Den Ergebnissen der  $\beta$ -Galaktosidase-Assays zur Folge, trat jedoch ein Aktivitätsverlust des *tsh*-Promotors infolge der Supplementation mit Hämoglobin auf (472 Units/ml). Die ermittelte Aktivität des *iss*-Promotors lag in diesem Medium zwar deutlich höher (1.733 Units/ml) als die des *tsh*-Promotors, blieb aber etwas unterhalb des Aktivitätslevels vom M9-Medium (2.064 Units/ml) bei ähnlicher OD<sub>600</sub>.

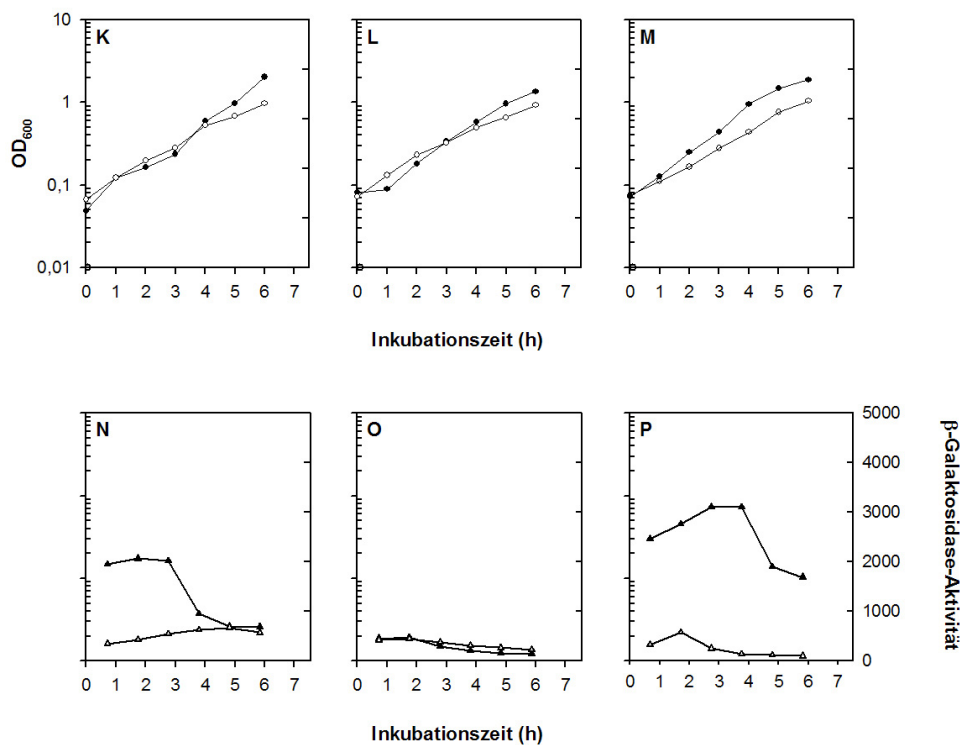


**Abb. 36 Grafische Darstellung des Wachstums der Transformanten im Mangelmedium M9 mit und ohne supplementiertem Hämoglobin und den Ergebnissen der  $\beta$ -Galaktosidase-Expression unter diesen Bedingungen.** Die Transformanten IlnpP1 (schwarzer Kreis) und IlnpP2 (weißer Kreis) in M9-Medium (G), supplementiert mit Hämoglobin (0,2 g/100 ml) (H) und Ergebnisse des  $\beta$ -Galaktosidase Tests zum Vergleich der Aktivität des *iss*- (schwarzes Dreieck) und *tsh*- (weißes Dreieck) Promotors unter diesen Inkubationsbedingungen [M9-Medium; (I), M9-Medium mit Hämoglobin; (J)].

### 2.8.3 Regulatorischer Effekt des Eisenchelators 2,2'-Dipyridyl (DIP)

Inwiefern eine Reduktion von frei verfügbaren Eisenionen Einfluß auf die Expression der Gene *tsh* und *iss* nimmt, wurde in Assays untersucht, bei denen die Transformanten in flüssigem M9-Medium mit dem Zusatz des eisenbindenden Chelators DIP inkubiert wurden. DIP bindet Eisenionen hat jedoch den Nachteil, dass die gebundene Form in der Lage ist, die

bakterielle Membran zu überwinden. Damit reichert es sich in Bakterien statischer Kulturen während des Wachstums an und wird für diese toxisch (Griffiths & Williams, 1999). Um einen eisenlimitierten Effekt bei gleichzeitig gutem Wachstum zu erhalten, musste die einzusetzende Konzentration des Chelators in Vorversuchen ausgetestet werden. Der Zusatz von 65  $\mu\text{M}$  DIP beeinträchtigte das Wachstum der Transformanten nicht, hatte aber eine Reduktion der Promotoraktivitäten von *IlnpP1* (462 Units/ml) und *IlnpP2* (472 Units/ml) zur Folge (siehe Abb. 37). Durch Zusatz von einem Überschuß an Eisenionen (40  $\mu\text{M}$   $\text{FeCl}_3$ ) sollte der Eisenmangel wieder kompensiert und eine gute Versorgung der Bakterien mit dem Metallion gewährleistet sein. *IlnpP1* wies nur einen leichten Anstieg (575 Units/ml) der Promotoraktivität auf, die immer noch etwas unterhalb der Aktivität in M9-Medium lag, während sich die Aktivität des *iss*-Promotors nicht nur auf Niveau des Wachstums in M9 befand, sondern sich noch steigern ließ (3.104 Units/ml). Die Bedeutung von Eisenionen als regulatorischer Effektor für die Promotoraktivität von *iss* ist demzufolge höher einzustufen, als für die Aktivität von *tsh* (siehe Abb. 37).

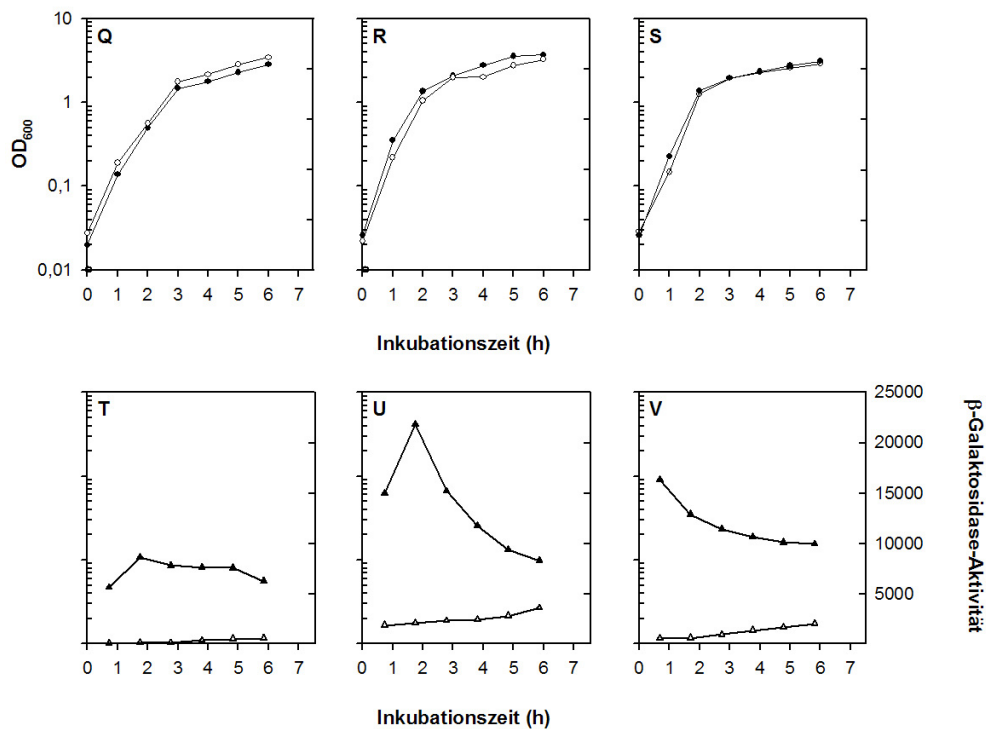


**Abb. 37 Grafische Darstellung des Wachstums der Transformanten im Mangelmedium M9, supplementiert mit DIP und DIP mit  $\text{FeCl}_3$  und den Ergebnissen der  $\beta$ -Galaktosidase-Expression unter diesen Bedingungen.** Wachstumskurven der Transformanten *IlnpP1* (schwarzer Kreis) und *IlnpP2* (weißer Kreis) in M9-Medium (K), supplementiert mit DIP (L), DIP mit  $\text{FeCl}_3$  (M) und Ergebnisse des  $\beta$ -Galaktosidase Tests zum Vergleich der Aktivität des *iss*- (schwarzes Dreieck) und *tsh*- (weißes Dreieck) Promotors unter diesen Inkubationsbedingungen [M9; (N), mit DIP; (O), mit DIP und  $\text{FeCl}_3$ , (P)].

## 2.8.4 Regulatorischer Effekt verschiedener Anzuchttemperaturen

Untersuchungen bezüglich der Hämoglobin-bindenden und -degradierenden Eigenschaften von Tsh hatten, abhängig von der Temperatur und dem transformierten Stamm, zu unterschiedlichen Ergebnissen geführt. C118, eine *E. coli* K12-Transformante, bei der *tsh* in einem pACYC184-Derivat überexprimiert wurde, wies eine deutliche Korrelation zwischen dem Level an sekretiertem Tsh und der Fähigkeit der Transformante zu hämagglutinieren auf. Beides war maximal bei einer Wachstumstemperatur von 26 °C nachzuweisen und nahm mit zunehmender Temperatur ab (Stathopoulos et al., 1999). Untersuchungen am Wildtyp APEC  $\chi$ 7122 ergaben keine solche Korrelation. Demnach wurde Tsh am effizientesten bei hohen Temperaturen sekretiert, während es am stärksten bei 26 °C hämagglutinierte (Stathopoulos et al., 1999). Die Promotorstudien von *ltnP1* in LB-Medium bei 26 °C, 37 °C und 42 °C bestätigen die Ergebnisse des APEC-Stammes  $\chi$ 7122. Die Promotoraktivität von *tsh* bei 26 °C betrug 677 Units/ml und stieg bei 37 °C auf 3.669 Units/ml an (siehe Abb. 38). Bei 42 °C, der Körpertemperatur des Huhnes, nahm die Aktivität wieder etwas ab (2.105 Units/ml). Offenbar unterscheidet sich die Regulation der *tsh*-Expression im APEC-Wildtyp wesentlich von der im *E. coli* K12-Stamm. Demnach lässt sich, entgegen der Annahme von Stathopoulos und Kollegen (Stathopoulos et al., 1999), der stärkere hämagglutinierende Effekt des Tsh im APEC-Wildtyp nicht unbedingt auf zusätzliche Proteine mit hämagglutinierenden Eigenschaften zurückführen, sondern eher auf eine veränderte Regulation der *tsh*-Expression in Abhängigkeit von der vorherrschenden Temperatur (womit grundsätzlich nicht ausgeschlossen werden soll, dass bei niedrigeren Temperaturen andere Hämagglutinine in APEC-Stämmen aktiv sind). Des Weiteren verifizierte sich, durch den Anstieg der Aktivität des *tsh*-Promotors bei höheren Temperaturen die Annahme, dass die Bedeutung des Autotransporters im Infektionsgeschehen erst mit dem Wirtskontakt besteht.

Die durch *Iss* vermittelte Serumresistenz setzt eine erfolgreiche Etablierung der Infektion des Wirtes und damit eine Temperatur von 42 °C voraus. Die Unterschiede in der Aktivität des *iss*-Promotors bei 26 °C (8.660 Units/ml) im Vergleich zu 37 °C (21.800 Units/ml) und 42 °C (16.400 Units/ml) machten deutlich, dass auch bei *iss* eine temperaturabhängige Regulation der  $\beta$ -Galaktosidase-Expression stattfand, dessen höchste Aktivität ebenfalls bei 37 °C ermittelt werden konnte (siehe Abb. 38). Bei 37 °C in LB-Medium wies der *iss*-Promotor im Vergleich zur Aktivität des *tsh*-Promotors einen extremen Aktivitätsunterschied von nahezu 18.000 Units/ml auf.



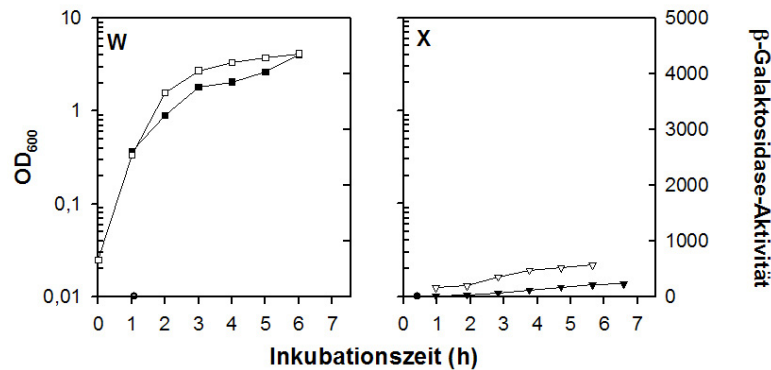
**Abb. 38** Grafische Darstellung des Wachstums der Transformanten in LB-Medium mit verschiedenen Inkubationstemperaturen und den Ergebnissen der  $\beta$ -Galaktosidase-Expression unter diesen Bedingungen. Wachstumskurven der Transformanten IlnpP1 (schwarzer Kreis) und IlnpP2 (weißer Kreis) in LB bei 30 °C (Q), 37 °C (R), 42 °C (S) und Ergebnisse des  $\beta$ -Galaktosidase-Tests zum Vergleich der Aktivität des *iss*- (schwarzes Dreieck) und *tsh*- (weißes Dreieck) Promotors unter diesen Inkubationsbedingungen [30 °C; (T), 37 °C; (U), 42 °C, (V)].

### 2.8.5 Regulatorischer Effekt des genetischen Hintergrundes

Dass die Regulation plasmidcodierter Gene mit chromosomal determinierten Faktoren zusammenhängen, konnte bereits für viele pathogene Stämme beschrieben werden. Die Wahrnehmung über Zwei-Komponenten-Sensor/Effektor-Proteinpaare hat Auswirkungen auf übergeordnete zelluläre Regulatoren (z.B. Fur, Sigmafaktoren und CAP), die direkt oder indirekt auf die virulenzassoziierten Faktoren des Plasmids Einfluß nehmen können (Silver & Walderhaug, 2008). Andersherum können aber auch die Plasmide regulatorische Proteine codieren, die Einfluß auf Faktoren des Chromosoms nehmen (Gomez-Duarte & Kaper, 1995). Dass der chromosomale Hintergrund des APEC-Stammes die Aktivität des *iss*- und *tsh*-Promotors beeinflusst, bestätigten vergleichende Promotorstudien mit dem transformierten *lac*-negativen *E. coli* K12-Stamm KT2442 (Cashel et al., 1996).  $\beta$ -Galaktosidase-Tests der Transformanten KTpP1 und KTpP2 ergaben in der Aktivität der Promotoren von *tsh* und *iss* große Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp (siehe Abb. 39). Ein Aktivitätsverlust des *iss*-



Promotors von über 20.000 Units/ml und des *tsh*-Promotors von  $\sim 3.000$  Units/ml im LB-Medium bei 37 °C lässt vermuten, dass die Anzahl exprimierter Iss- und Tsh-Moleküle pro Zelle und damit die Promotorstärke wesentlich über chromosomal determinierte Faktoren reguliert wird. Damit konnte eine Korrelation der Expression p1ColV<sub>5155</sub>-lokalisierter Gene in Abhängigkeit von chromosomal codierten Regulatoren bestätigt werden.

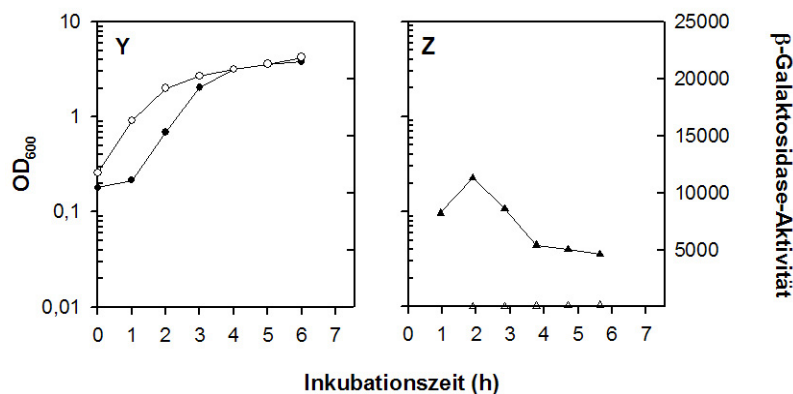


**Abb. 39 Grafische Darstellung von Wachstumskurven der Transformanten KTpP1 und KTpP2 in LB-Medium und den Ergebnissen der  $\beta$ -Galaktosidase-Expression unter diesen Bedingungen.** Wachstumskurven der Transformanten KTpP1 (schwarzes Quadrat) und KTpP2 (weißes Quadrat) in LB-Medium bei 37 °C (W) und Ergebnisse des  $\beta$ -Galaktosidase-Tests zum Vergleich der Aktivität des *iss*- (schwarzes Dreieck) und *tsh*- (weißes Dreieck) Promotors unter diesen Inkubationsbedingungen (X).

## 2.8.6 Regulatorischer Effekt von Serum

Obwohl kommerziell erworbenes Hühnerserum (Invitrogen) aufgrund der fehlenden Antikörperreaktionen nicht die Bedingungen für Bakterien im Serum infizierter Hühner widerspiegeln kann, lassen sich doch bestimmte eingeschränkte Wachstumsbedingungen herstellen, deren Einfluss auf die Regulation der Promotoraktivität von *tsh* und *iss* von Interesse war. Die Generationszeit des Wildtypstammes IMT5155 im Serum war im Vergleich zum LB-Medium nur geringfügig verlangsamt (siehe Abschnitt 2.5.1) und auch die Transformanten zeigten im Serum kaum Wachstumsunterschiede zum Wildtyp (siehe Abb. 40). Entsprechend der Bedeutung von Iss für den Infektionsprozess von APEC konnte eine Promotoraktivität der Transformante von 11.400 Units/ml ermittelt werden, die damit deutlich oberhalb der Aktivität des Promotors in TSB-Medium lag. Der *tsh*-Promotor zeigte nur eine geringfügige Aktivität (234 Units/ml) bei gleichzeitig gutem Wachstum der Transformante im Serum (OD<sub>600</sub> 4,2; siehe Abb. 40). In der Literatur beschriebene Wachstums-Assays mit der *tsh*-Mutante (*tsh::tetAR*)  $\chi$ 7273 im Serum hatte eine Reduktion

der Mutante von  $10^3$  Bakterien über einen Wachstumszeitraum von 3 h ergeben. Verglichen wurde hierbei mit dem APEC-Wildtyp  $\chi 7122$ , der eine 10-fache Zunahme an Bakterien und dem *E. coli* K12-Stamm ( $\chi 7276$ ), der eine Reduktion von  $10^5$  Bakterien aufwies (Dozois, 2000). Die  $\beta$ -Galaktosidase-Expressionsstudien mit dem *tsh*-Promotor von p1ColV<sub>5155</sub> lassen unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht erkennen, dass die Expression von *tsh* durch das Serum als Effektor beeinflusst wird. Demzufolge dürfte auch eine Mutation des Gens keine Auswirkung auf die Sensitivität des Bakteriums gegen Serum haben.



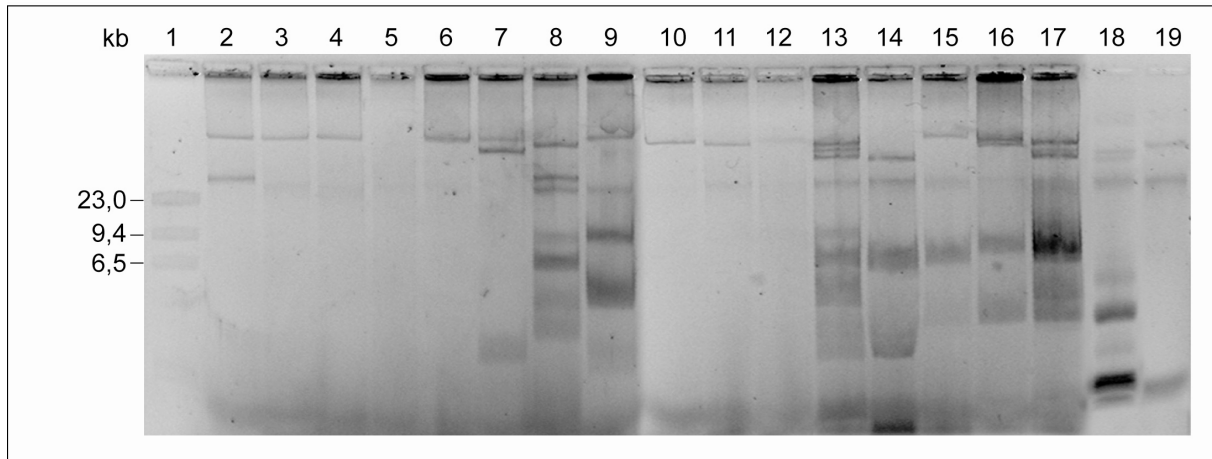
**Abb. 40 Grafische Darstellung von Wachstumskurven der Transformanten InnpP1 und InnpP2 im Serum und den Ergebnissen der  $\beta$ -Galaktosidase-Expression unter diesen Bedingungen.** Wachstumskurven der Transformanten InnpP1 (schwarzer Kreis) und InnpP2 (weißer Kreis) in Serum (Y) und Ergebnisse des  $\beta$ -Galaktosidase-Tests zum Vergleich der Aktivität der *iss*- (schwarzes Dreieck) und *tsh*- (weißes Dreieck) Promotoren unter diesen Inkubationsbedingungen (Z).

## 2.9 Plasmidprofile pathogener und apathogener *E. coli*-Stämme

### 2.9.1 Plasmidprofile verschiedener NMEC-Isolate

Innerhalb der ExPEC-Gruppe gilt der Nachweis von ColV-Plasmiden als Charakteristikum des APEC-Pathotyps (Skyberg et al., 2008; Ewers et al., 2007; Skyberg et al., 2006; Ewers et al., 2004; Tivendale et al., 2004; Nolan et al., 2003; Fantinatti et al., 1994). In UPEC-Stämmen lassen sich hochmolekulare Plasmide nachweisen, die jedoch selten mit der Codierung von Colizinen im Zusammenhang stehen. Über das Auftreten von hochmolekularen Plasmiden bei NMEC war zu dem Zeitpunkt dieser Dissertation noch nicht allzuviel bekannt. Inwiefern hochmolekulare Plasmide auch innerhalb des NMEC-Pathotyps für horizontale Genübertragungen eine Rolle spielen könnten, sollten daher die Plasmidprofile von 16 NMEC-Isolaten verdeutlichen. Den Ergebnissen zufolge konnten mit Ausnahme von BK658 bei allen anderen untersuchten NMEC-Isolaten 1-3 hochmolekulare und z. T. mehrere

niedermolekulare Plasmide nachgewiesen werden (siehe Abb. 41). Die Plasmidprofile bestätigen, zusammen mit den Ergebnissen verschiedener Multiplex-PCRs, das Auftreten von ColV-Plasmiden innerhalb dieses Pathotyps (Ewers et al., 2009).

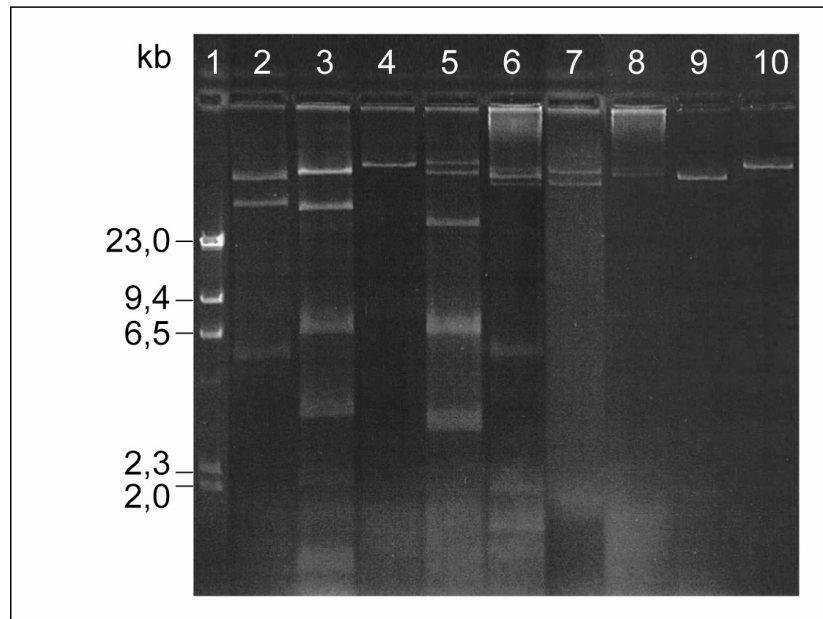


**Abb. 41 Elektropherogramm nativer Plasmidprofile verschiedener NMEC- und Referenzstämmen.** Aufarbeitung der Bakteriensuspension erfolgte entsprechend der modifizierten Kado-Lyse (Kado & Liu, 1981). Die gelelektrophoretische Auftrennung und anschließende Anfärbung der Banden entsprachen den Bedingungen für hochmolekulare Plasmide.

1- 23 kb-Marker, 2- IHE 3034, 3- IHE 3036, 4- IHE 3080, 5- BK 658, 6- B 10363, 7- B 13155, 8- VE 239, 9- VE 1140, 10- E 817, 11- E 247, 12- RS 218, 13- RS 176, 14- C 183-77, 15- IHE 3055, 16- BE1-2928, 17- RS 179, 18- V517 (*E. coli* K12 mit Referenzplasmiden; 56; 36; 7,7; 9,5; 4,2; 3,2; 2,9 und 2,2 kb), 19- R27 (*E. coli* K12 mit Referenzplasmid; 170 kb)

### 2.9.2 Plasmidprofile verschiedener apathogener aviärer *E. coli*-Stämme

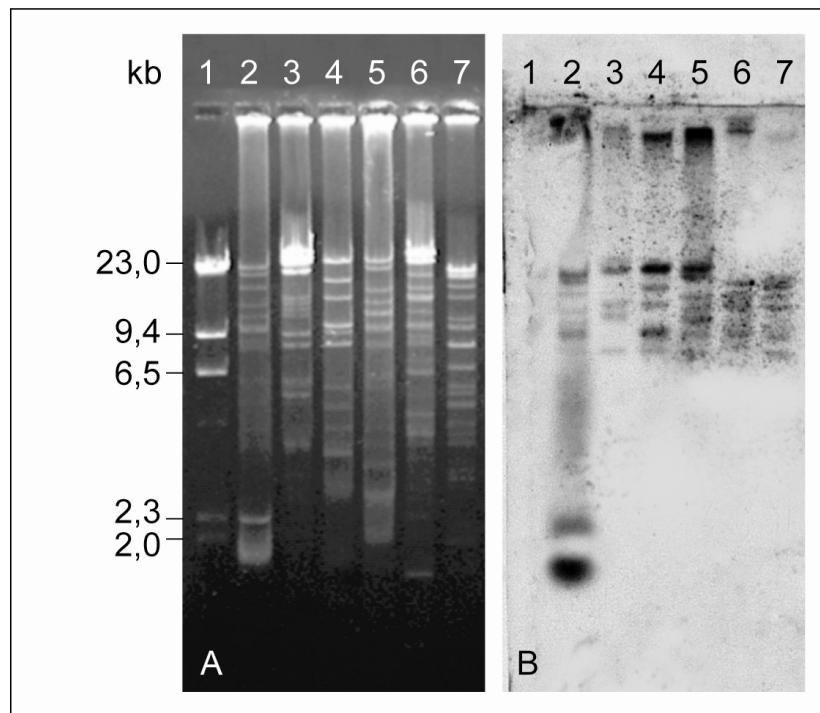
Untersuchungen an 10 *E. coli*-Isolaten, die aus der Stallluft ( $A_{\text{environ}}$ ) und aus dem Kot gesunder Tiere ( $A_{\text{fecal}}$ ) stammten sollten zeigen, inwiefern die mit Pathogenität assoziierten ColV-Plasmide tatsächlich nur in Isolaten klinischem Ursprungs nachzuweisen sind. Die Isolate wurden mittels Multiplex-PCR auf verschiedene APEC-spezifische plasmid- und chromosomal codierte Markergene untersucht. Interessanterweise ließen sich auch in diesen Stämmen eine Reihe virulenzassoziierter Gene des ColV-Plasmids (*cvi/cvaA*, *iss*, *tsh*, *traT*, *iucD*, *iroN* und *sitD*) und des Chromosoms (z. B. für die Expression von Fimbrien (*papC*, *fimC*), von Curli (*csgA*) und dem äußeren Membrantransporter A (*ompA*)) nachweisen (Ewers et al., 2009). Das daraufhin erstellte Plasmidprofil der aviären *E. coli*-Isolate ergab in allen Fällen den Nachweis von mindestens einem hoch- und mehreren niedermolekularen Plasmiden (siehe Abb. 42).



**Abb. 42 Elektropherogramm nativer Plasmidprofile verschiedener aviärer *E. coli*- und Referenzstämmen.** Die Aufarbeitung der Bakteriensuspension erfolgte mit Hilfe der modifizierten Kado-Lyse (Kado & Liu, 1981). Die gelelektrophoretische Auftrennung und anschließende Anfärbung der Banden entsprachen den Bedingungen für hochmolekulare Plasmide. 1-  $\lambda$ -HindIII-Marker, 2- IMT6487 (*A<sub>fecal</sub> E. coli*), 3- IMT2111 (*APEC*), 4- IMT10740 (*A<sub>environ</sub> E. coli*), 5- IMT10718 (*A<sub>fecal</sub> E. coli*), 6- IMT10676 (*A<sub>environ</sub> E. coli*), 7- IMT10674 (*A<sub>environ</sub> E. coli*), 8- IMT6483 (*A<sub>fecal</sub> E. coli*), 9- R27 (*E. coli* K12 mit Referenzplasmid; 170 kb), 10- R478 (*E. coli* K12 mit Referenzplasmid; 251 kb)

### 2.9.3 Plasmidabgleich verschiedener *E. coli*- und ExPEC-Isolate mit p1ColV<sub>5155</sub>

Um über den Nachweis einzelner Gene hinaus die Ähnlichkeit der Plasmide von *A<sub>environ</sub>* und *A<sub>fecal</sub> E. coli* sowie von pathogenen ExPEC-Isolaten (UPEC und NMEC) zu p1ColV<sub>5155</sub> aufzeigen zu können, wurden die Plasmide für DNS-DNS-Hybridisierungszwecke nach der Methode von Nies isoliert (Nies et al., 1987), restringiert und nach gelelektrophoretischer Auftrennung auf einer Nylonmembran überführt und hitzefixiert. Das mittels Random-Priming vollständig Dig-gelabelte Plasmid p1ColV<sub>5155</sub> wurde anschließend als DNS-Sonde eingesetzt und ergab, dass die großen Plasmidfragmente der apathogenen als auch der humanpathogenen *E. coli*-Stämme mit dem gelabelten aviären ColV-Plasmid hybridisierten (siehe Abb. 43). Offenbar stimmen große DNS-Sequenzabschnitte des Plasmid-Kerngenoms unabhängig von der Pathogenität und Herkunft des Stammes überein.



**Abb. 43 Elektropherogramm (A) und Autoluminogramm (B) hochmolekularer Plasmide verschiedener apathogener und pathogener *E. coli*-Isolate.** Von den isolierten Plasmiden wurden jeweils 5 µl in einem 20 µl-Ansatz über Nacht *Eco*RI restringiert und vollständig gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die DNS-Fragmente wurden mittels Southern Blot-Verfahren auf die Nylonmembran transferiert, hitzefixiert und gegen das Dig-gelabelte ColV<sub>5155</sub>-Plasmid hybridisiert.  
 1-  $\lambda$ -*Hind*III-Marker, 2- IMT5155 (APEC), 3- IMT11089 (NMEC), 4- IMT9285 (UPEC), 5- IMT9286 (UPEC), 6- IMT6487 (*A*<sub>fecal</sub> *E. coli*), 7- IMT10666 (*A*<sub>environ</sub> *E. coli*)

### 3 Diskussion

Hühner haben als Nutztiere eine große Bedeutung für die menschliche Ernährung. In der Rangordnung der weltweit am meisten produzierten Hauptfleischarten (Schwein, Rind, Schaf, Ziege und Geflügel) befindet sich das Geflügel je nach Kontinent auf Platz 1 oder 2, da es unabhängig von religiösen oder ethischen Gründen verzehrt wird. Die wirtschaftliche Bedeutung des Geflügels hat zu großen Mastgeflügel- und Legebatteriebeständen geführt, durch die der weltweit stetig steigende Bedarf an Geflügelfleisch und Eiern abgedeckt wird. Besonders bei der Hennenhaltung in Legebatterien und der Jungtieraufzucht fördert der geringe Raum den Stress der Tiere und erhöht ihre Anfälligkeit für Krankheiten (Sorensen, 1997). Unabhängige wissenschaftliche und sozioökonomische Studien haben sich für Maßnahmen zum Verbot der konventionellen Käfighaltung von Legehennen ausgesprochen, denen EU weit aus Gründen des Tierschutzes ab 2012 Folge geleistet wird. Obwohl sich die Haltungsbedingungen der Legehennen durch eine Umstellung auf sogenannte „ausgestaltete“ Käfige oder Alternativsysteme (Freiland- oder Bodenhaltung) erheblich verbessern wird, geben die Tierbestandsaufnahmen von Deutschland aus dem Jahre 2007 wieder, dass mit 41,4 Mio. Legehennen und 579,7 Mio. eingestellten Broilern eine Intensivhaltung von Geflügel vorliegt, die immer eine räumlich eingeschränkte Haltungsform zur Folge haben wird (Zentrale Markt- und Preisberichtsstelle; [www.zmp.de](http://www.zmp.de)). Da die Intensivhaltung eine schnelle Verbreitung von Infektionskrankheiten ermöglicht wird befürchtet, dass gerade durch die mangelnden Hygieneverhältnisse bei der Freiland- und Bodenhaltung die krankheitsbedingten Probleme in Geflügelmasten gefördert werden. Neben dem Anstieg virusbedingter und parasitärer Erkrankungen des Geflügels wird auch eine Zunahme der Bedeutung bakterieller Zoonoseerreger, wie *Salmonella ssp.* und *Campylobacter spp.* vermutet, wodurch das Risiko lebensmittelbedingter Erkrankungen für den Menschen zunimmt.

Zurzeit rufen aviäre pathogene *E. coli* (APEC)-Stämme verschiedener Serotypen Erkrankungen des Geflügels, mit weltweit erheblichen wirtschaftlichen Verlusten hervor. Begünstigt durch prädisponierende, die Immunabwehr schwächende Primärinfektionen und Umweltfaktoren (Stress, hohe Temperaturen, hohe Gehalte an Ammonium) führen Infektionen mit APEC-Stämmen, infolge der geringen genetischen Variabilität der Tiere, zu einer schnellen Ausbreitung innerhalb des Bestandes mit hoher Morbiditäts- und Mortalitätsrate (Dho-Moulin & Fairbrother, 1999; Sorensen, 1997). Die Infektion der Tiere erfolgt aerogen durch fäkal kontaminierten Staub oder durch Aufnahme von kontaminiertem Futter bzw. Wasser. Über einen bisher nicht vollständig aufgeklärten Mechanismus durchdringen die Bakterien die Schleimhäute des Atmungs- oder Verdauungstraktes und

werden systemisch. Pathogene *E. coli*-Stämme der gleichen Serotypen rufen auch Erkrankungen beim Menschen hervor, wie z. B. Harnwegsinfektionen, Neugeborenen-Meningitis und Septikämie, deren Behandlung mit hohen medizinischen Kosten verbunden ist (Mokady et al., 2005a; Mokady et al., 2005b). Diese vogel- und humanpathogenen *E. coli*-Stämme, die außerhalb des Gastrointestinaltraktes Infektionen hervorrufenden werden gleichermaßen in der Gruppe der extraintestinal pathogenen *E. coli* (ExPEC) zusammengefasst (Bahrani-Mougeot et al., 2002). Molekularbiologische Untersuchungen mittels subtraktiver Hybridisierung und PCR hatten ergeben, dass über 100 Sequenzen verschiedener human- und vogelpathogener ExPEC-Stämme nicht im *E. coli* K12-Stamm nachzuweisen waren (Mokady et al., 2005b; Walker & Verma, 2002; Janke et al., 2001; Akopyants et al., 1998). Diese Sequenzen konnten als typische virulenzassoziierte Faktoren der Pathogruppe identifiziert werden. Hierzu zählen Adhäsine (z. B. Typ 1-, S-, F- und P-Fimbrien; afimbrielle Adhäsine) Toxine (z. B.  $\alpha$ -Hämolysin, zytotoxisch nekrotischer Faktor 1, zytolethal wirkendes Toxin), Proteasen (z. B. äußeres Membranprotein A, Temperatursensitives Hämagglutinin, Serin-Protease), Eisenaufnahmesysteme (z. B. Aerobaktin, Salmochelin, SitABCD) und Kapselpolysaccharide (z.B. K1-Kapsel) (Li et al., 2005; Mokady et al., 2005a). In der Regel liegen diese Sequenzen auf mobilen genetischen Elementen (MGEs) kombiniert auf Pathogenitätsinseln (PAIs) im Chromosom und auf extrachromosomalen Plasmiden vor. Die Tatsache, dass eine Reihe spezifischer Sequenzen nur auf Plasmiden vogelpathogener *E. coli*-Isolate nachzuweisen sind, könnte in einer Wirtsspezifität für aviäre *E. coli*-Stämme (APEC) begründet sein (Ron, 2006). Die hochmolekularen Plasmide, die i. d. R. aus APEC-Isolaten des septikämischen Krankheitsgeschehens isoliert werden können, sind mit der Produktion von Colicinen, besonders häufig dem Colicin V assoziiert. Die erzielten Ergebnisse dieser Arbeit charakterisieren das Colicin V (ColV)-Plasmid p1ColV<sub>5155</sub> des APEC-Stammes IMT5155 (O2:K1:H5) und geben, zusammen mit den derzeitigen Erkenntnissen der Literatur weitere Einblicke über die mögliche Bedeutung der Plasmide für APEC-Stämme. Vier zentrale Aspekte stehen daher bei der Diskussion im Vordergrund:

1. Wie ähnlich sind sich die DNS-Sequenzen der ColV-Plasmide unterschiedlicher APEC-Isolate des O2-Serotyps?
2. Wie groß ist die Ähnlichkeit von APEC-Stämmen zu humanpathogenen ExPEC-Stämmen bezogen auf ColV-spezifische Sequenzen? Ist die Annahme einer Wirtsspezifität des Plasmids gerechtfertigt?

3. Wirken sich Faktoren (wie z.B. Hämoglobin, Serum und Eisenmangel), die mit einer Wirtsinfektion im Zusammenhang stehen, regulatorisch auf die Expression virulenzassoziiierter Gene des ColV-Plasmids aus?
4. Welche Bedeutung lässt sich für die ColV-Plasmide, bezogen auf die Virulenz von APEC-Stämmen ableiten?

### 3.1 Ähnlichkeit der ColV-Plasmide unterschiedlicher APEC-O2-Isolate

Vor etwa 80 Jahren wurde mit den Untersuchungen von ColV-Plasmiden humanpathogener und veterinärmedizinischer Isolate begonnen (Waters & Crosa, 1991). Ein detaillierter Vergleich von ColV-Plasmiden basierend auf DNS-Sequenzen ist allerdings erst seit wenigen Jahren möglich, da sich die Kosten für Sequenzanalysen drastisch verringert und damit auch für hochmolekulare Plasmide auf ein erschwingliches Maß reduziert haben. pAPEC-O2-ColV [Acc. NC\_007675] ist das erste vollständig sequenzanalytierte ColV-Plasmid aus einem *E. coli* O2-Serotyp eines septikämischen Huhnes gewesen (Johnson et al., 2006c). Ihm folgten die vollständigen DNS-Sequenzinformationen anderer hochmolekularer Plasmide dieses Serotyps (pAPEC-O2-R [Acc. AY214164]), des Serotyps O1 (pAPEC-O1-ColBM [Acc. DQ381420], pAPEC-O1-R [Acc. DQ517526]), O103 (pAPEC-O103-ColBM [Acc. NC\_011964]) und O78 (pAPEC-1 [Acc. NC\_011980]), die mit Ausnahme von pAPEC-1, alle in Amerika aus septikämischen Hühnern isoliert worden waren (Johnson & Nolan, 2009; Mellata et al., 2009; Johnson et al., 2006b; Johnson et al., 2006c; Johnson et al., 2006d; Johnson et al., 2005b). Mit p1ColV<sub>5155</sub> liegen nun weitere DNS basierte Informationen über ein ColV-Plasmid des Serotyps O2 aus Deutschland vor, das ebenfalls aus dem septikämischen Krankheitsgeschehen eines Huhnes stammte. Der Vergleich der Größe und genetischen Organisation zweier Plasmide eines Serotyps aus verschiedenen Teilen der Welt ist unter dem Gesichtspunkt der verwandtschaftlichen Verhältnisse bzw. einer möglichen Serotypspezifität von Interesse.

Die Sequenzanalyse von p1ColV<sub>5155</sub> konnte nicht vollständig abgeschlossen werden. Insgesamt wurden 154 kb der Plasmidsequenz analysiert, wobei an zwei Stellen des Plasmids Teilsequenzinformationen unbekannter Größe fehlen und der Transfer(*tra*)-Bereich von der Analyse vollständig ausgenommen war. Durch DNS-DNS-Hybridisierungen mit plasmid-spezifischen DNS-Sonden und der Cosmid-Genbibliothek des APEC-Stammes IMT5155 sollten Cosmide mit möglichst überlappenden ColV-Sequenzen ermittelt werden. Genbanken, bei denen die Gesamt-DNS durch eine Restriktionsendonuklease wie z. B. *Sau*IIIa in verpackungsgerechte Sequenzabschnitte überführt wurden haben den Nachteil, dass sie



chimäre Cosmidklone aufweisen können. Chimäre Klone besitzen direkt an den Ligationseenden zwischen 300-500 bp kurze Sequenzen Plasmid- oder chromosomaler DNS mit einer *SauIII*A-Schnittstelle, die im nativen Plasmid gar nicht oder aber nicht an dieser Stelle auftreten würden. Aufgrund eines solchen chimären Cosmidklons ergab einer der DNS-DNS-Hybridisierungsergebnisse fälschlicherweise eine Überlappung der Cosmidklone GB5155E5 und GB5155B27, während die Sequenzanalyse von p1ColV<sub>5155</sub> stattdessen eine Überlappung von GB5155E5 mit dem Cosmidklon GB5155D27 aufzeigte. Eine sequenzanalytisch bestätigte Überlappung der DNS-DNS-Hybridisierungen trat ebenfalls noch bei den Cosmidklonen GB5155F44 und GB5155D34 auf, wodurch zwei Mal die zusammenhängende Analyse von jeweils über 45 kb Plasmidsequenz möglich wurde. Im Gegensatz zu pAPEC-O2-ColV [Acc. NC\_007675] und den meisten anderen untersuchten ColV-Plasmiden unterscheidet sich p1ColV<sub>5155</sub> in dem Nachweis nur eines Replikationsursprungs (RepFIIA bzw. IncIIA), der stromaufwärts der *tra*-Region gelegen ist. Der Unterschied liegt vermutlich darin begründet, dass sich bei IMT5155 nur ein hochmolekulares Plasmid nachweisen ließ. Häufig treten bei APEC-Stämmen ein bis fünf  $\geq 100$  kb große Plasmide auf, von denen i. d. R. eines die genetischen Marker des Colicin-codierenden Plasmids aufweist, während die anderen Plasmide entweder Resistenzen gegen verschiedene Antiinfektiva vermitteln (R-Plasmide) oder als Hilfsplasmide die Konjugation Colicin-codierender Plasmide mit einem funktionslosem *tra*-Operon veranlassen (Chlosta et al., 2006; Johnson et al., 2006b; Stehling et al., 2003; Ginns et al., 1998). pAPEC-O2-ColV [Acc. NC\_007675] besitzt zwei Replikationsursprünge RepFIB und RepFIIA, deren Bedarf darin begründet liegt, dass das Plasmid mit dem Multiresistenz-Plasmid pAPEC-O2-R [Acc. AY214164] co-konjugiert (Chlosta et al., 2006). Das Replikon-Typing von 1015 Colicin VBM-codierenden Plasmiden pathogener und einiger apathogener *E. coli*-Isolate humanen und tierischen Ursprungs hatte, entsprechend dem Nachweis der Replikons von pAPEC-O2-ColV [Acc. NC\_007675], ein signifikant höheres Auftreten von RepFIB bei APEC-Plasmiden ergeben (Johnson et al., 2007a). Die RepFIB-Replikationsregion umfasst *repA*-Gene, die sich benachbart zu dem Aerobaktin-Transportsystem auf einer genetischen Insel befinden, die von zwei *IS1*-Elementen flankiert wird (Waters & Crosa, 1991; Waters & Crosa, 1988; Waters & Crosa, 1986). Das Fehlen von RepFIB bei p1ColV<sub>5155</sub> könnte mit dem Verlust des zweiten flankierenden *IS1*-Elements der RepFIB-Region zusammenhängen. Die, das Aerobaktin-Operon flankierenden Insertionssequenzen spielen eine wesentliche Rolle für die Verbreitung dieses Genabschnitts mittels spezifischer Integrase (Waters & Crosa, 1986). Möglicherweise hatte vor Insertion des Sequenzbereiches in p1ColV<sub>5155</sub> eine ungenaue

Exzision der transponierbaren DNS-Sequenz stattgefunden. Die Deletion des zweiten IS1-Elements könnte der Grund für eine genetische Variabilität sein, die eventuell auch mit einer stabilen Insertion des DNS-Sequenzabschnitts in p1ColV<sub>5155</sub> assoziiert ist.

p1ColV<sub>5155</sub> weist nach den vorliegenden sequenzanalytischen Ergebnissen fünf verschiedene Insertionssequenzen (IS1, IS2, IS911, IS30 und IS91) für Transposasen auf, die z. T. mit mehreren Kopien auf dem Plasmid vorkommen. Die Insertionssequenzen fassen genetische Inseln ein, die dadurch transponierbar und für das Auftreten von spezifischen Genkopplungen verantwortlich sind. PCR-Untersuchungen an pAPEC-O2-ColV [Acc. NC\_007675] und 595 APEC-Isolaten unterschiedlichen Serotyps ergaben für dieses Plasmid und für 74 % der untersuchten Isolate ein gekoppeltes Auftreten der Gene des Eisen-/Mangantransportsystems Sit (*sitABCD*) und des Aerobaktin-Operons (*iucABCD*, *iutA*), sowie für 78 % von *iss* und den Genen des Salmochelin-Operons (*iroBCDEN*). Das Gen des Temperatursensitiven Hämagglutinins (*tsh*) konnte nur bei pAPEC-O2-ColV [Acc. NC\_007675] und einem geringeren Prozentsatz (46 %) der untersuchten Isolate gekoppelt mit dem ColV-Operon (*cvaABC*, *cvi*) nachgewiesen werden (Chlosta et al., 2006). Auch bei p1ColV<sub>5155</sub> treten diese Gene und Operons gekoppelt auf, aber die flankierenden IS-Elemente haben offenbar zu einer veränderten Abfolge und Orientierung der Loki auf dem Plasmid geführt.

Ein weiterer Unterschied zwischen p1ColV<sub>5155</sub> und pAPEC-O2-ColV [Acc. NC\_007675] besteht in dem Nachweis von Plasmidsequenzen des multiresistenten Stammes G8430 von *Salmonella enterica ssp. enterica* Serovar Typhimurium pU302 [Acc. AY333434] bei p1ColV<sub>5155</sub>. Dieser *Salmonella*-Stamm besitzt ein 3,2 kb (pU302S) [Acc. AY333433] und ein 84,5 kb (pU302L) [Acc. Y333434] großes Plasmid (Chen et al., 2007). Ähnlich p2<sub>5155</sub> weist pU302S Übereinstimmungen zur Familie der ColE1-Plasmide [Acc. NC\_001371] auf, während p1ColV<sub>5155</sub> und pU302L große Ähnlichkeiten zur Familie der F- [Acc. AP001918] bzw. R100-Plasmide [Acc. AP000432] aufweisen. Die Bedeutung von p2<sub>5155</sub> für IMT5155 ist derzeit noch völlig unklar. Während pU302S eine Kanamycin-Resistenz durch die Aminoglykosid 3'-Phosphotransferase Typ I vermittelt, ist das Ampicillin-Resistenz vermittelnde Gen *bla*, ähnlich dem Hämolyisin-codierenden Gen *hly*, bei p2<sub>5155</sub> N'-terminal verkürzt und nicht funktionsfähig. Neben drei Genprodukten mit noch unbekannter Funktion (YafZ [Acc. CAE55803], YfjX [Acc. CAE55804] und YeeS [Acc. CAI43901]), liegen zwei weitere putative Orfs (10,2 kDa Orf [Acc. NP\_040359] und 13,8 kDa Orf [Acc. NP\_040360]) für die Replikation codiert auf dem mit hoher Kopienzahl bei IMT5155 nachweisbaren Plasmid vor. Eine Initiation der Replikation findet durch die Interaktion von RNS I/RNS II-Molekülen dieser Orfs statt und wird durch einen RNS I-Modulator (*rom*) reguliert

(Tomizawa, 1984; Tomizawa & Som, 1984). Kommt es durch die Expression des RNS I-Modulators zu keiner Interaktion der RNS-Moleküle, bindet RNS II [GenID 2717250] an *oriV* und wird in einer RNase H vermittelten Reaktion anschließend so prozessiert, dass ein freies 3'-OH-Ende als Primer für die Polymerase I entsteht (Dasgupta et al., 1987; Kornberg & Scott, 1978).

Wie die Replikation von p2<sub>5155</sub> reguliert wird ist allerdings nicht ganz klar, da *rom* mit Hilfe des Analysenprogramms nicht nachgewiesen werden konnte. Ebenso fraglich ist, in welchem Zusammenhang p2<sub>5155</sub> und dessen Replikation mit p1ColV<sub>5155</sub> und/oder dem Chromosom von IMT5155 steht.

Die Ähnlichkeit der hochmolekularen Plasmide pU302L [Acc. Y333434] und p1ColV<sub>5155</sub> bezieht sich auf Systeme, die die Plasmidreplikation und zudem die Stabilität der Plasmide betreffen. Im Gegensatz zu pAPEC-O2-ColV [Acc. NC\_007675] weisen sie drei Toxin-Antitoxin-Loki zur Abtötung plasmidfreier Bakterienzellen auf sowie identische Systeme zur Übertragung einzelsträngiger Plasmid-DNS und zur Unterdrückung der dadurch ausgelösten SOS-Antwort der Bakterienzelle (Gerdes et al., 2005; Helinski et al., 1996). Unter dem Gesichtspunkt, dass das Plasmid pU302L [Acc. AY333434] nicht mittels Konjugation transferiert werden kann, ist das Auftreten dieser DNS-Sequenzen allerdings interessant. Neben *oriT* fehlen die Gene der *tra*-Region, deren Vollständigkeit und Funktionalität auch für p1ColV<sub>5155</sub> bis jetzt nicht nachgewiesen wurde (Chen et al., 2007). Für pU302L [Acc. AY333434] ist noch völlig unklar, warum diese Gene während der Evolution des Plasmids nicht deletiert wurden. Eine mögliche Erklärung wäre, dass sie durch Modulation der Stressantwort helfen, die Plasmidstabilität bei gleichzeitiger evolutionsbedingter Veränderung zu erhalten (McKenzie et al., 2000). Plasmidsequenzen sind sehr viel häufiger von Mutationen betroffen, als das restliche Bakterienchromosom (Dobrindt, 2005). Die Akkumulation von Mutationen (Deletionen und Insertionen) ermöglicht dem Bakterium letztendlich eine schnelle Adaptation an veränderte Umweltbedingungen, sofern diese Schädigungen der DNS ohne Aktivierung der zelleigenen SOS-Antwort erhalten bleiben. Darin könnte auch der Vorteil für p1ColV<sub>5155</sub> bestehen, da fehlgeschlagene Konjugationsversuche mit mehreren verschiedenen *E. coli*-Stämmen und verschiedenen Methoden die Konjugationseigenschaften des Plasmids grundsätzlich in Frage stellen lassen. Da die Konjugationsversuche mit einer Mutante von IMT5155 durchgeführt wurden, die durch eine Transposon-Insertion in *traG* durch die eingebrachte Kanamycin-Resistenz selektionierbar wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Mutation der Grund für das fehlende Konjugationsverhalten des Stammes war. TraG spielt zusammen mit TraD eine

wesentliche Rolle bei der Separierung der doppelsträngigen DNS für die Plasmidübertragung und versorgt zudem den DNS-Transport während der Konjugation mit Energie (Minkley & Ippen-Ihler, 1977). Aus diesem Grund wurden die Versuche parallel mit der zweiten Mutante des Plasmids (IMTp1F07) durchgeführt, die keine Deletion im *tra*-Operon, sondern in dem bis dato unbekannten *orff07* aufweist. Aber auch mit diesem Stamm konnten keine Transkonjuganten nachgewiesen werden. Mittlerweile sind drei weitere ColV-Plasmide bekannt (pAPEC-1 [Acc. NC\_011980], pAPEC-O103-ColBM [Acc. NC011964], pVM01 [Acc. NC\_010409]), die nicht zu einer eigenständigen Konjugation befähigt sind. Ein fehlendes Konjugationsverhalten könnte auch mit der fehlende Phagensensitivität von IMT5155 in Zusammenhang stehen. Ähnlich *E. coli*-Stämmen mit dem ColV,I-K94-Plasmid (Goodson & Rowbury, 1987), konnte auch bei IMT5155 keine Plaquebildung durch P1*vir* im Bakterienrasen nachgewiesen werden. Untersuchungen am BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin, *E. coli*-Referenzlabor) hatten zudem ergeben, dass IMT5155 nicht nur gegen Angriffe von P1*vir*, sondern offenbar gegen eine Vielzahl von Phagen resistent ist. Verwendet wurden hierbei ein K1-Phagenpool bestehend aus 46 Phagen A-E, die in RTD und höheren Konzentrationen geprüft wurden (Persönliche Mitteilung, Dr. Steinrück, 2006). Dieses Ergebnis könnte ebenfalls für eine nicht-funktionelle *tra*-Region von p1ColV<sub>5155</sub> und gegen die Ausbildung eines konjugativen Pilus sprechen.

Im Unterschied zu pU302L [Acc. Y333434] und p1ColV<sub>5155</sub> fehlt pAPEC-O2-ColV [Acc. NC\_007675] des Weiteren die zusätzliche DNS-Übereinstimmung von einem 13,5 kb großen Genbereich mit sieben unbekannten offenen Leserahmen, der möglicherweise durch die Aec53-Transposase der IS66 Familie zwischen pU302L [Acc. AY333434] und p1ColV<sub>5155</sub> transpositioniert wurde. Entsprechend den Faltungseigenschaften und nachgewiesenen Bindedomänen lassen sich die putativen Proteine der unbekannten *orfs* mit regulatorischen Eigenschaften in Zusammenhang bringen. Auf die Proteinfunktion bezogene Schlagwörter, die bei den Analysen des zu pU302L [Acc. AY333434] 100 % ähnlichen translatierten DNS-Sequenzbereiches auftraten, betrafen die SOS-Zellantwort, Reparatur von DNS, sowie die Bindung von ATP und Nukleotiden. Möglicherweise ist der unbekannte, 13,5 kb große Sequenzbereich damit auch für eine veränderte Plasmidstabilität verantwortlich. Fünf verschiedene Methoden, die alle unterschiedliche physiologische Angriffspunkte nutzten, um eine plasmidfreie Mutante von IMT5155 zu generieren, waren auch nach Überprüfung von insgesamt 10<sup>4</sup> Bakterien erfolglos geblieben. Ein ähnliches Verhalten zeigte auch pU302L in *S. enterica ssp. enterica* Typhimurium, obwohl den hochmolekularen Plasmiden dieser Spezies im Allgemeinen ein schneller Verlust nachgesagt

wird. Beide Plasmide werden, auch in *E. coli* K12-Stämmen transformiert, stabil zwischen den Generationen weitergegeben, obwohl ein veränderter chromosomaler Hintergrund in den meisten Fällen einen Plasmidverlust fördert. Damit unterscheidet sich p1ColV<sub>5155</sub> wesentlich in der Stabilität von pAPEC-O2-ColV [Acc. NC\_007675].

Trotz der phänotypischen Unterschiede zwischen pAPEC-O2-ColV [Acc. NC\_007675] und p1ColV<sub>5155</sub> hat der Vergleich der DNS-Sequenzen beider ColV-Plasmide des APEC-O2-Serotyps aus den USA und Deutschland, eine Ähnlichkeit von 51,6 % (ohne *tra*-Region und IS-Elemente) ergeben. Die Gegenüberstellung der 201 offenen Leserahmen von pAPEC-O2-ColV [Acc. NC\_007675] mit den 174 *orfs* von p1ColV<sub>5155</sub> hat deutlich gemacht, dass nicht nur die mit ColV-Plasmiden typischerweise assoziierten Gene *iss*, *tsh* und die verschiedenen Eisenaufnahmesysteme ähnlich sind, sondern auch weite Teile der stromauf- und abwärts dieser Gene und Operons gelegenen Sequenzen nahezu identisch sind. Die Übereinstimmung ColV-spezifischer bzw. in genetischen Inseln gekoppelte Sequenzabschnitte teilen beide Plasmide mit den ColV-Plasmiden anderer *E. coli*-Serotypen, die damit keine Serotypspezifität darstellen (Chlosta et al., 2006). Möglicherweise hängt das unterschiedliche Resistenz-, Konjugations- und Stabilitätsverhalten beider Plasmide auch mit der differierenden Abfolge und Orientierung einiger Loki zusammen, die auch zu einer veränderten Regulation innerhalb der Abschnitte geführt haben könnte. Unterschiede im Replikationsursprung und der Anzahl nachweisbarer IS-Elemente beider ColV-Plasmide lassen zudem vermuten, dass die genetische Mosaikstruktur der ColV-Plasmide innerhalb des *E. coli*-O2-Serotyps mehrfach entstanden ist. Übereinstimmungen in der Plasmidgröße und der genfaktoriellen Zusammensetzung scheinen dabei wesentlich von dem Selektionsdruck des gemeinsamen Habitats und der dort auftretenden Bakterienflora beeinflusst zu sein.

### 3.2 Ähnlichkeit von aviären und humanen ColV-Plasmiden

Die ersten phäno- und genotypischen Untersuchungen wurden an Plasmiden (pColV,I-K94 und pColV-K30 [Acc. AJ223631]) vorgenommen, die aus *E. coli*-Stämmen humaner Infektionsgeschehen isoliert worden waren. Mit Hilfe dieser Plasmide konnte die Bedeutung von Aerobaktin für die Aufnahme von Eisenionen in Konkurrenz zum Wirt (Bindereif & Neilands, 1985) und die von *Iss* für die Serumresistenz (Binns et al., 1979) pathogener extraintestinaler *E. coli* verifiziert werden. *E. coli*-Isolate, die zu septikämischen Infektionen bei Kälbern, Hühnern und Lämmern geführt hatten, wiesen ebenfalls zu 78 % ColV-Plasmide auf (Smith & Huggins, 1976). Folgeuntersuchungen an 731 humanen *E. coli*-Stämmen, die in dem Zeitraum von 1972-1978 aus Fäces, Urin und Blut isoliert wurden, ergaben in 62 % der Fälle den Nachweis von ColV-Plasmiden bei Isolaten aus dem Blut und zu einem deutlich

geringeren Prozentsatz (28-43 %) bei Isolaten aus den anderen klinischen Materialien (Fernandez-Beros et al., 1990; Davies et al., 1981). Seit diesen frühen Ergebnissen haben eine Vielzahl weiterer Untersuchungen an ColV-Plasmide aus ExPEC-Stämmen humanen und tierischen Ursprungs stattgefunden, deren Spezifität und Beitrag zur Virulenz der Stämme allerdings häufig sehr unterschiedliche in der Literatur diskutiert wurde.

### 3.2.1 Colicin V

Der neueren Literatur zur Folge wurden Colicin V-codierende Plasmide im Vergleich zu den humanen ExPEC-Isolaten bevorzugt aus vogelpathogenen *E. coli*-Stämmen isoliert, was zu der Annahme einer wirtsspezifisch assoziierten Virulenz des ColV-Plasmids geführt hatte (Ron, 2006). Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen keine solcher wirtsspezifisch assoziierten Virulenz der Plasmide, die auch mit hoher Prävalenz in NMEC-Isolaten nachgewiesen werden konnten. Die Plasmidprofile von 16 NMEC-Stämmen bestätigen zusammen mit ihrer genotypischen Charakterisierung (Ewers et al., 2007) vielmehr die frühen Untersuchungsergebnisse von ColV-Plasmiden, wonach deren Nachweis offenbar wesentlich mit dem klinischen Auftreten des bakteriellen Erregers im Blut assoziiert ist. Sowohl das durch NMEC- als auch durch APEC-Stämme hervorgerufene Krankheitsbild hängt wesentlich von dem Grad der vorangegangenen Bakteriämie ab. Den Colicin V-codierenden Plasmiden mag zudem im Lebenszyklus der humanen und tierischen ExPEC-Isolate noch eine wesentliche Rolle zukommen, die mit dem Nachweis der Stämme im Darm ihrer Wirte zusammenhängt. Dass das Mikrozin Colicin V selbst keine Bedeutung für die Virulenz von pathogenen *E. coli*-Stämmen hat, konnte bereits 1979 durch Inaktivierung des Colicin V-codierenden Strukturgens (*cvaC*) gezeigt werden. Demnach war der Stamm mit dem Plasmid trotz inaktivem Colicin V mit derselben Mortalitätsrate assoziiert wie der Wildtyp (Quackenbush & Falkow, 1979). Untersuchungen von Smith und Huggins (Smith & Huggins, 1976) hatten aber gezeigt, dass bei einer Mischpopulation von Colicin V-produzierenden (10 %) und nicht-produzierenden (90 %) *E. coli*-Stämmen nach siebentägiger Infektion nur noch Colicin V-produzierende Bakterien aus dem Wirt re-isoliert werden konnten. Da sowohl human- als auch tierpathogene ExPEC-Isolate offenbar in der Lage sind, den Darm asymptomatisch zu besiedeln (Russo & Johnson, 2003; Johnson & Russo, 2002; Russo & Johnson, 2000), könnte aus evolutionsbiologischer Sicht die Produktion von Colicinen für das Fortbestehen in diesem, mit vielen *Enterobacteriaceae*-Spezies besiedelten Reservoir ein Selektionsvorteil darstellen. Da bei UPEC- im Vergleich zu APEC- und NMEC-Isolaten in deutlich geringerem Umfang Colicin V-codierende Plasmide nachgewiesen werden konnten, müssen noch weitere Faktoren die Fitness und Konkurrenzfähigkeit der ExPEC im Darm beeinflussen.

### 3.2.2 ColV-Plasmid vermittelte Adhärenz und Invasivität

Aussagen bezüglich einer ColV-Plasmid vermittelten Adhärenz sind seit Jahren widersprüchlich. Clancy und Savage schlossen 1981 durch *in vitro* Versuche mit Intestinalzellen von Mäusen auf eine Korrelation zwischen der Adhäsion des untersuchten *E. coli*-Stammes und dem Nachweis des ColV-Plasmids H247. Ihrer Vermutung zur Folge war der F-Pilus des Plasmids für die Interaktion zwischen Bakterium und Intestinalzellen verantwortlich, was allerdings in nachfolgenden Versuchen mit entsprechenden Mutanten nicht bestätigt werden konnte (Clancy & Savage, 1981). Curli, Typ 1-, S- bzw. F1C- und P-Fimbrien lassen sich in pathogenen ExPEC-Stämmen nachweisen, sind aber typischerweise nicht mit ColV-Plasmiden assoziiert. Bei dem ColV-Plasmid pO78V aus dem APEC-Stamm 789 konnte mittels Phagensensitivitäts-Assay und RT-PCR der Nachweis eines Typ IV-Pilus erfolgen. Typ IV-Pili sind Oberflächenstrukturen vieler gramnegativer Bakterien, die Veränderungen in der bakteriellen Bewegung, eine Kompetenz zur Aufnahme von DNS, sowie Adhärenz vermitteln (Collins et al., 2005). Obwohl eine pO78V-Transkonjugante keine Epithelzell-Adhärenz vermittelte, mag der Typ IV-Pilus für APEC 789 eine wichtige Rolle bei der Etablierung einer Infektion spielen (Gophna et al., 2003). Die Gene des Pilustyps konnten bis jetzt jedoch auf keinem weiteren ColV-Plasmid von APEC- bzw. ExPEC-Stämmen nachgewiesen werden, der damit offenbar keine wesentliche Rolle für die pColV-vermittelte Adhäsion spielt. Der konjugative Transfer eines hochmolekularen Colicin-codierenden Plasmids (E-Plasmid) aus einem septikämischen APEC-Stamm (SEPT13) in einen nicht-pathogenen und nicht-invasiven aviären *E. coli* (MS101), hatte die veränderte Fähigkeit der Transformante zur Adhäsion und Invasion von humanen Hep-2-Zellen sowie zur Adhäsion an epitheliale Trachealzellen zur Folge (Stehling et al., 2003). Die Suche nach den verantwortlichen Genen für diesen Phänotyp ergab neben einer Vielzahl unbekannter offener Leserahmen auch die Identifikation von drei *orfs* mit großer Ähnlichkeit zu *traX*, *yceA* und *yccB*. Alle drei *orfs* sind auch bei dem Plasmid pWR100 [Acc. AL391753] von *Shigella flexneri* nachgewiesen worden und sollen wesentlich die Invasionsfähigkeit des Bakteriums beeinflussen (Buchrieser et al., 2000). Adhäsions- und Invasions-Assays mit der aviären Fibroblastenzelllinie CEC-32 und den Bakterienstämmen IMT5155, dem invasiv pathogenen *Salmonella enterica ssp. enterica*-Stamm SL1344 [NC\_003198], dem apathogenen aviären *E. coli*-Stamm IMT5104, DH5 und der p1ColV<sub>5155</sub> *E. coli* K12-Transformante (IMTp1D01) ergaben Adhäsions-Unterschiede zwischen den pathogenen und apathogenen Stämmen, die allerdings nicht so signifikant ausgefallen waren, wie vermutet. Der Literatur zur Folge wird der *E. coli* K12-Stamm DH5 routinemäßig für die Erforschung von

Adhäsionseigenschaften nach entsprechender genetischer Transformation eingesetzt. Trotzdem ist nicht auszuschließen, dass DH5, ähnlich dem vollständig sequenzanalysierten *E. coli* K12-Stamm MG1655 [NC\_000913], ein Adhäsin im Genom aufweist, durch das die schwach adhäsiven Eigenschaften eines transformierten Genproduktes nicht erkennbar wären. Möglicherweise ist dies der Grund, weshalb die Adhäsionsversuche von DH5 und IMTp1D01 mit CEC-32 nicht signifikant unterschiedlich ausfielen. Damit wäre eine mögliche Schlussfolgerung des Versuchs, dass das ColV-Plasmid keine oder nur eine geringe Bedeutung für die Adhäsivität von IMT5155 besitzt.

Untersuchungen an einer isogenen *tsh*-Mutante des Wildtyps IMT5155 hatten eine Reduktion der Adhäsion an aviäre Fibroblastenzellen CEC-32 um ein Drittel (27,7 %) zur Folge. Obwohl die verringerten adhäsiven Eigenschaften der *tsh*-Mutante frühere Ergebnisse einer anderen Arbeitsgruppen bestätigen (Dozois et al., 2002) ist zu vermuten, dass die adhäsiven Eigenschaften von Tsh nur unterstützend und unter sehr spezifischen Bedingungen nachzuweisen sind. Die Vermutung einer eher untergeordneten Bedeutung des Tsh hängt auch mit dessen Nachweishäufigkeit innerhalb der APEC zusammen. Verschiedene PCR-geführte Untersuchungen hatten gezeigt, dass das *tsh* im Vergleich zu anderen plasmidassoziierten Genen (*traT*, *iss*, *iroN*) in prozentual geringerem Umfang bei APEC-Isolaten auftrat (Johnson et al., 2006c; Ewers et al., 2007). Auch die Untersuchungen zum Nachweis und der Bedeutung des Gens innerhalb des UPEC-Pathotyps hatte zu uneinheitlichen Ergebnissen geführt. Die Untersuchungen von 66 UPEC-Stämmen im IMT, FU-Berlin ergaben mit 4,5 % nur eine geringe Prävalenz des Gens (Ewers et al., 2007), während in einer amerikanischen Studie das *tsh*, bei gleicher Untersuchungsmethode, mit 63 % (n=87) in UPEC-Isolaten nachzuweisen war (Janke et al., 2001). Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten darauf zurückzuführen sein, dass das *tsh* auch bei den UPEC nicht zum konservierten Genpool zählt und damit vermutlich eine untergeordnete Bedeutung für die Adhäsion des Pathotyps besitzt. Allerdings ergaben Untersuchungen an dem Tsh eines UPEC-Isolates eine verstärkte Expression des Gens, mit nachfolgend hoher Nachweisrate des Proteins im Urin infizierter Mäuse, womit grundsätzlich eine adhäsive Bedeutung des Proteins für UPEC in der Blase bestätigt wurde (Heimer et al., 2004).

Deutliche Unterschiede traten bezüglich der Invasivität der untersuchten Stämme SL1344 [NC\_003198], IMT5104, DH5 und IMTp1D01 auf, die nur bei SL1344 [NC\_003198] und in abgeschwächter Form bei IMT5155 bestätigt werden konnte. Die fehlende Invasivität der Plasmid-Transformante bestätigte die Analyse der DNS-Sequenz von p1ColV<sub>5155</sub>, wonach keine mit Invasivität assoziierten Gene nachzuweisen waren. Damit ist die Invasivität von



IMT5155 offenbar nur an chromosomal codiert vorliegende Loki wie z.B. die GimB-PAI gekoppelt.

### 3.2.3 ColV-Plasmid vermittelte Serumresistenz

Die Fähigkeit pathogener *E. coli*-Isolate, den bakteriostatischen und bakteriziden Eigenschaften des Serums zu entgehen, ist komplex und multifaktoriell. Lipopolysaccharide, Kapsel- und Oberflächenproteine vermitteln den Bakterien eine Resistenz und sind chromosomal codiert (Waters & Crosa, 1991). Das 26 kDa große TraT-Protein ist Teil der Transferregion von Plasmiden und wird unabhängig von den Funktionen des Transfers bei Bedarf exprimiert (Achtman et al., 1980; Skurray et al., 1976). Während *traT* grundsätzlich bei konjugativen Plasmiden nachzuweisen ist, ist das Vorkommen von *iss* offenbar spezifisch an Colicin-produzierende Plasmide gekoppelt (Chuba et al., 1989; Binns et al., 1979). Damit galt *iss* in einigen Veröffentlichungen bisher als wichtigster genetischen Marker zur Identifikation von APEC. Neuere Untersuchungen zur Prävalenz von *iss* haben zu dem Ergebnis geführt, dass *iss* offenbar mit drei Allelen auftritt. Die Untersuchung von 487 human- und tierpathogenen *E. coli*-Isolaten auf alle genetischen Varianten des *iss*, hatte die Prävalenz des Gens für die gesamte ExPEC-Gruppe deutlich erhöht (Johnson et al., 2008). Wachstumsversuche im Serum mit Transkonjuganten, die humane ColV-Plasmide (pColV, I-K94 und pColV-H247) aus *E. coli*-Isolaten des Blutes, aber auch des Urogenitaltraktes (pRK100) aufwiesen, vermittelten den Akzeptor-Stämmen (*E. coli*-K12) offenbar eine erhöhte Resistenz im Serum (Nolan et al., 2003; Ambrozic et al., 1998; Binns et al., 1979). Die Untersuchungsergebnisse dieser Arbeit bestätigten ein ebenfalls signifikant verbessertes Wachstum der Transformante IMTp1D01 im Vergleich zu DH5 im Serum. Untersuchungen an pAPEC-1 [Acc. NC\_011980] des APEC-Stamm  $\chi$ 7122 ergaben wiederum keine große Bedeutung von *Iss* für die Serumresistenz (Mellata et al., 2003). Um die Rolle von *Iss* für die Komplementresistenz weiter zu verifizieren, wurde eine *iss*-Deletionsmutante des APEC-Stamm A2363 generiert, die kein Wachstum im Serumresistenztest ergab. Mit der Rückführung des Gens konnte das Resistenzlevel des Wildtyps wiederhergestellt werden, was als weiterer Beweis für eine wesentliche Bedeutung von *Iss* für die Serumresistenz von ExPEC-Isolaten mit ColV-Plasmiden gilt (Lynne et al., 2007).

### 3.2.4 Bedeutung der verschiedenen eisenakquirierenden Systeme

Für *E. coli* und den meisten anderen bekannten Bakterienspezies spielen Eisenionen als Co-Faktor von essentiellen metabolischen Enzymen eine wichtige Rolle (Andrews et al., 2003). Die Versorgung des Bakteriums erfolgt, wie die aller *Enterobacteriaceen*, mit Hilfe der

chromosomal codierten Siderophore Enterobaktin und dem Transporter FeoB, der  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen aus dem umgebenden Medium aufzunehmen vermag (Kammler et al., 1993). Pathogene Bakterien befinden sich während ihres Lebenszykluses zeitweilig in der Umwelt und im Wirt, mit dem sie in direkter Konkurrenz um Eisenionen stehen. Aus diesem Grund ist die positive Selektion zusätzlicher Eisenchelatoren für das Weiterbestehen pathogener Bakterien evolutionsbiologisch sinnvoll. Uropathogene *E. coli*-Stämme codieren insgesamt bis zu 10 verschiedene Eisentransportsysteme, wobei die ColV-Plasmid assoziierte Siderophore Aerobaktin bei UPEC im Allgemeinen weniger häufig auftritt (Ewers et al., 2007). Offenbar macht die Vielzahl der eisenakquirierenden Systeme die Versorgung der UPEC unempfindlich gegenüber pH-Wert-Schwankungen des Urins und anderer Habitate. Alle von UPEC codierten Transportsysteme lassen sich mit unterschiedlichen Prävalenzen auch bei APEC- und NMEC-Isolaten nachweisen (Ewers et al., 2007). Bei dem APEC-Stamm IMT5155 konnten neben Enterobaktin und FeoB noch vier zusätzliche chromosomal codierte eisenakquirierende Systeme nachgewiesen werden. Neben verschiedenen Gene des Yersiniabaktins (*irp2*, *fyuA* und *int*), das ursprünglich auf der Hochpathogenitätsinsel (HPI) von *Yersinia spp.* nachgewiesen wurde (Carniel, 1999), konnten zusätzlich noch die Gene des TonB-abhängigen Häm-Rezeptor-/Transporterproteins ChuA (Torres & Payne, 1997), des Siderophoren-Rezeptors IreA (Russo et al., 2001) und des Transportsystems SitABCD (Janakiraman & Slauch, 2000) mittels PCR nachgewiesen werden. DNS-DNS-Hybridisierungen mit spezifischen DNS-Sonden für Aerobaktin (Williams, 1979), Salmochelin und dem Sit-Transportsystem (Janakiraman & Slauch, 2000) ergaben zudem positive Hybridisierungsergebnisse mit DNS-Sequenzen von p1ColV<sub>5155</sub>. Inwiefern die Vielzahl unterschiedlicher chromosomal- und plasmidcodierter eisenakquirierender Systeme aufeinander abgestimmt oder gemeinsam die Versorgung der APEC mit Eisenionen übernehmen, ist *in vitro* nur schwer zu untersuchen, da die *in vivo*-Bedingungen sehr komplex sind. *In vivo* findet die Bindung des Mikronährstoffs durch die Siderophore in Gewebsflüssigkeiten wie Serum oder der Mukosa statt. Hier konkurrieren sie mit den eisenbindenden Glykoproteinen des Wirtes (Transferrin und Laktoferrin) um das zentrale Metallion, wobei Effektivität und Zusammenspiel der Chelatoren vermutlich durch eine Vielzahl weiterer Faktoren in den Körperflüssigkeiten beeinflusst werden (Griffiths & Williams, 1999). Um trotzdem eine Vorstellung über die Funktionalität der einzelnen Systeme des ColV<sub>5155</sub>-Plasmids zu bekommen, wurden für Untersuchungen dieser Arbeit drei Cosmide, die jeweils die DNS-Sequenzinformationen von Aerobaktin, Salmochelin und dem Sit-Transportsystem aufwiesen, in den Enterobaktin-defizienten *E. coli* HB101-Stamm 1017

elektroporiert (Daskaleros et al., 1991). Der Vorteil in der Verwendung der Cosmidklone lag in dem PCR-geführten Nachweis von jeweils nur einem Transportsystem, womit ein direkter Bezug zwischen einem phänotypischen Merkmal der Transformante und dem codierten System möglich war. Bei den transformierten DNS-Sequenzen von p1ColV<sub>5155</sub> konnten zudem mit Hilfe eines Promotorsuchprogramms die jeweils beschriebenen Promotorsequenzen der Systeme und die Bindedomäne Fur, dem wichtigsten Regulator von eisenabhängigen Genen und Operons, bestimmt werden. Wachstums-Assays im flüssigen Eisenkomplexmedium CAS zeigten deutlich, dass Aerobaktin unter den gewählten Mangelbedingungen *in vitro* die Siderophore mit der stärksten Affinität für Eisenionen darstellte. Die Expression und Sekretion der Siderophore konnte wesentlich durch einen induzierten Mangel an Eisenionen mit dem Eisenchelator DIP erhöht und durch die Zugabe von Eisenionen wieder kompensiert werden.

Dieses Ergebnis wird bestätigt durch Untersuchungen von Skyberg et al. an isogenen knock-out-Mutanten der pAPEC-O2-ColV [Acc. NC\_007675] codierten Gene *iutA* (Aerobaktin-Operon), *iroN* (Salmochelin-Operon) und *sitA* (SitABCD-Operon) des APEC-O2-Stammes [Acc. NC\_008563] (Skyberg et al., 2008). In einer quantitativen Real-time-PCR konnte gezeigt werden, dass besonders *iutA* im Eisenmangelmedium Urin signifikant herauf reguliert wurde (Skyberg et al., 2008). Die Regulation des Salmochelins (*iroN*) betreffend, gibt es allerdings einen signifikanten Unterschied zwischen den Ergebnissen dieser Arbeit und denen von Skyberg und Kollegen. Während die *E. coli* 1017-Transformanten dieser Arbeit sowohl bei CAS-Assays auf festen als auch im flüssigen Medium eine verlangsamte Generationszeit, sowie kleinere Zellen mit nicht messbarer Siderophorenaktivität aufwiesen, ergab die qualitative Real-time-PCR von Skyberg et al. eine deutlich erhöhte Transkription von *iroN* in humanem Urin. Die ermittelte Divergenz in der Bedeutung des Salmochelins, kann unterschiedliche Gründe haben. Zum einen befand sich die codierende Sequenz des Salmochelins von pColV<sub>5155</sub> nicht im chromosomalen Hintergrund des Wildtyps, sondern in einem *E. coli* K12-Stamm und unterlag demzufolge einer anderen Regulation als im Wildtyp. Eine andere mögliche Erklärung liegt in einer divergierenden Bedeutung des Salmochelins in *Salmonella*- und pathogenen *E. coli*-Stämmen begründet. Während das Salmochelin in *Salmonella*-Sämen primär als Transportsystem für die Akquirierung von Eisenionen auftritt, wird es in UPEC-Isolaten offenbar für die Vermittlung einer zusätzlichen bakteriellen Adhärenz benötigt. Untersuchungen an dem Salmochelin-Rezeptor des UPEC-Stammes CFT073 [Acc. NC\_004431] zur Folge, kommt IroN eine zentrale Rolle für die bakterielle Anheftung an die epithelialen Zellen des Urogenitaltraktes zu (Feldmann et al., 2007). Die

Expression des Rezeptors wird wesentlich durch den Stoffwechselmetaboliten D-Serin reguliert, der in hohen Konzentrationen im menschlichen Urin vorkommt (Haugen et al., 2007) und damit möglicherweise ein wesentlicher Grund für die fehlende Transkription des Rezeptors auf CAS-Agar ist.

### **Mögliche Bedeutung der chromosomal- und plasmidcodierten Sit-Operons für IMT5155**

Dass eisenakquirierende Systeme möglicherweise noch andere Funktionen als nur die Aufnahme von Metallionen übernehmen, könnte auch im Fall der chromosomal und plasmidcodierten Sit-Operons von IMT5155 zutreffend sein. Der Cosmidklon GB5155D14 weist, der DNS-Sequenzanalyse des Klons zur Folge, einen vollständigen chromosomal codierten Sit-Lokus auf (persönliche Mitteilung, Laternus, C., IMT FU-Berlin). Trotzdem haben Assays, für die das Cosmid in den Enterobaktin-defizienten *E. coli* K12-Stamm 1017 elektroporiert worden war, auf CAS-Agar ein schlechtes Koloniewachstum mit geringer Affinität für Eisenionen ergeben. Dieselben Bedingungen haben bei dem plasmidcodierten Sit-Lokus in *E. coli* 1017 zu einem guten Koloniewachstum mit hoher Affinität geführt, deren Absorptionswerte im Flüssigtest an die von Aerobaktin heranreichten. Untersuchungen des Sit-Operons von pAPEC-1 [Acc. NC\_011980] des APEC-Stammes  $\chi$ 7122 bezogen auf die Aufnahme und den Transport von Eisenionen bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit und belegen die Bedeutung des Sit ABCD-Operons für die Aufnahme von  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen durch eine entsprechende *E. coli* K12-Transformante. Weiterführende Untersuchungen des Sit-Operons von pAPEC-1 [Acc. NC\_011980] hatten ergeben, dass der ABC-Transporter ebenfalls in der Lage ist, den Verlust des MntH-vermittelten Transportes von Mangan zu kompensieren (Sabri et al., 2006). MntH fungiert in *S. enterica ssp. enterica* Serovar Typhimurium, *Shigella* spp. und *E. coli* als Protonen-abhängiger divalenter Kationentransporter. Während das Sit-Operon in den beiden enteropathogen invasiven Spezies eine größere Rolle für den Mangantransport spielt, ergab sich für die untersuchten ExPEC-Stämme (APEC  $\chi$ 7122 und UPEC CFT073 [Acc. NC\_004431]) eine wesentliche Bedeutung für den Eisentransport (Kehres & Maguire, 2003; Kehres et al., 2002a; Kehres et al., 2002b). Grundsätzlich vermag der Sit-ABC-Transporter aber in allen Spezies, entsprechend der zellulär bestehenden Mangelbedingung, entweder Eisen- oder Manganionen aufzunehmen. SitABCD und MntH spielen gerade für pathogene Bakterien eine wichtige Rolle, da über den Import von Mangan die Ausbildung protektiver Eigenschaften gegenüber Wasserstoffperoxid vermittelt wird (Kehres et al., 2002b). Phagozytierende Zellen des eukaryotischen Immunsystems nutzen toxische Sauerstoffformen, um aufgenommene Bakterienzellen abzutöten. Die Fähigkeit des Pathogenen, sich vor freien Radikalen und der oxidativen Zerstörung durch

Wasserstoffperoxid zu schützen, hängt wesentlich von dessen Versorgung mit Mangan ab. In diesem Zusammenhang steht offenbar auch der Nutzen des plasmidcodierten Sit-Lokus bei APEC-Isolaten. Die APEC nutzen nach erfolgter Adhäsion an das tracheale Epithel des Wirtes unterschiedliche Mechanismen, um dem abtötenden Effekt der Heterophilen und Makrophagen des Blutes zu entgehen. Einige Isolate sind in der Lage, nach erfolgter Phagozytose in den Makrophagen für eine Zeit zu überleben. Sie benutzen die Makrophagen zum einen als schützende Hülle vor weiteren Angriffen der Immunantwort und zum anderen als Carrier für ihren Übertritt ins Blut (Mellata et al., 2003; Pourbakhsh et al., 1997). Andere Isolate umgehen die phagozytotische Zerstörung, indem sie selbst zytotoxisch wirken. Durch bakterielle Induktion der Kaspase 3 in den Makrophagen kommt es zur Apoptose der phagozytierenden Zellen (Bastiani et al., 2005; Rodrigues et al., 1999). Makrophagen-Assays mit IMT5155 hatten gezeigt, dass dieser Stamm offenbar in der Lage ist, in Makrophagenzellen zu persistieren. Ausgehend von einer Infektionsdosis von  $3,0 \times 10^5$  Bakterien/ $3,0 \times 10^4$  Makrophagenzellen (J774) waren nach einem Zeitraum von 24 h noch  $8,6 \times 10^4$  Bakterien aus J774 zu reisolieren. Paralleluntersuchungen mit IMTp1D01 hatten ergeben, dass die Fähigkeit des Stammes in Makrophagen persistieren zu können, offenbar zu einem bedeutenden Teil an das Vorhandensein des ColV-Plasmids (re-isolierte Anzahl transformierter Bakterien nach 24 h:  $2,3 \times 10^4$  KbE/ml) gekoppelt ist. Die protektiven Eigenschaften werden dabei sehr wahrscheinlich durch das plasmidcodierte Sit-Operon hervorgerufen. Ähnlich den Siderophoren Enterobaktin, Aerobaktin, Salmochelin und Yersiniabaktin scheint auch bei dem plasmidcodierten Sit-ABC-Transporter eine Veränderung des pH-Wertes regulatorische Auswirkungen zu haben (Valdebenito et al., 2006; Corsa, 1999). Während die verschiedenen Siderophoren infolge von pH-Wert-Änderungen aufeinander abgestimmte Aktivitätsunterschiede aufzeigen, verändert sich bei dem Sit-Transporter offenbar abhängig vom pH-Wert die Affinität für das Metallion. Während das ABC-Transportsystem bei nahezu neutralem pH-Wert offenbar Eisenionen akquiriert, steigert sich bei einem abgesenkten pH-Wert seine Bedeutung für die Aufnahme von Manganionen. Die chromosomale Variante des Sit-ABC-Transporters von IMT5155 akquiriert bei neutralem pH-Wert keine Eisenionen. Inwiefern das Transportsystem eine erhöhte Affinität für Manganionen oder eine vollkommen andere Funktion besitzt ist nicht bekannt. Ebenso wenig, ob das System eventuell aufgrund eines fehlenden transkriptionellen Regulators auf dem Cosmid keine Aktivität zeigte.

Die mit Col V-Plasmiden assoziierten Eigenschaften der Serumresistenz und des Transportes von Metall-, im Wesentlichen Eisenionen, sind sowohl bei humanen als auch veterinär-

medizinischen ExPEC-Isolaten nachzuweisen (Waters & Crosa, 1991). Es gibt Überlegungen, wonach APEC als Zoonoseerreger in der Lage sind, diese virulenzassoziierten Eigenschaften über ColV-Plasmide auf humane *E. coli*-Stämme zu übertragen (Johnson et al., 2007b; Johnson et al., 2006a; Ron, 2006; Johnson et al., 2002a; Johnson et al., 2001b; Johnson et al., 2000). Die DNS-DNS-Hybridisierung von Plasmiden aus UPEC- und NMEC-Isolaten mit p1ColV<sub>5155</sub> als Sonde und die Prävalenz hochmolekularer ColV-Plasmide in NMEC-Stämmen lassen die Vermutung zu, dass die hochmolekularen Plasmide human- und tierpathogener *E. coli*-Isolate eine große Ähnlichkeit zueinander aufweisen. Vergleicht man die Ergebnisse molekularbiologischer Untersuchungen, die zur näheren Charakterisierung der uropathogenen ColV-Plasmide pRK100 und p1658/97 [Acc. AF550679] geführt haben, mit den Informationen der sequenzanalysierten aviären Plasmide, erklären sich die Übereinstimmungen. Diesen hochmolekularen ExPEC-Plasmiden ist die Ähnlichkeit zu großen Sequenzabschnitten der F- [Acc. AP001918] und R100-Plasmide [Acc. AP000342] gemeinsam, die i. d. R. den konjugativen Transfer, die Plasmidreplikation und die Systeme zu Erhaltung der Plasmidstabilität umfassen (Sampei & Mizobuchi, 2000; Blattner et al., 1997). Handelt es sich bei den Plasmiden der ExPEC-Isolate zudem um Colicin V- codierende, treten zusätzlich noch die, mit diesem Plasmid typischerweise assoziierten Gene (z. B. Colicin V-Operon, *iss*, *tsh*, Aerobaktin) auf und bedingen eine sich über viele Kilobasen erstreckende hohe Ähnlichkeit der DNS-Sequenzen zueinander (Waters & Crosa, 1991). Die große genetische Übereinstimmung der ExPEC-Plasmide hängt offenbar mit denselben Bedingungen innerhalb ihrer Habitate zusammen, die in allen Fällen eine Reduktion verfügbarer Eisenionen sowie die Abwehrmechanismen der Immunantwort höherer Wirbeltiere umfassen.

### 3.3 Regulation der Expression von *iss* und *tsh*

Die koordinierte Regulation der Genaktivität, in Abhängigkeit zu Veränderungen der Umwelt, ist eine allgemeine Fähigkeit von Mikroorganismen, sich flexibel und schnell anzupassen. Für pathogene Bakterien ist die genetische Reaktion auf Veränderungen der Umwelt von größter Bedeutung, da sie in der Regel während ihres biologischen Zyklusses unterschiedliche Habitate besiedeln. Daraus resultiert auch die Notwendigkeit der Expression verschiedener Proteine. Die Gene hochmolekularer Plasmide codieren zumeist stoffwechselphysiologisch relevante und/oder virulenzassoziierte Faktoren, die zusammen mit chromosomal codierten Proteinen häufig durch Mangel an stickstoff- oder phosphathaltigen Verbindungen, Schädigung der DNS, Erhöhung der Temperatur, Veränderung des pH-Wertes oder der Osmolarität co-exprimiert werden. Ein Mangel an Mikronährstoffen wie z. B.  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,

$\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Fe}^{2+}$  induziert die Expression virulenzassoziierter Gene bei einer Vielzahl pathogener Mikroorganismen (Finlay & Falkow, 1997; Mekalanos, 1992).  $\text{Mn}^{2+}$ - und  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen spielen, für die Regulation der Siderophoren und Transportsysteme Aerobaktin, Salmochelin und SitABCD im Zusammenhang mit den globalen Regulatoren Fur und MntH eine Rolle (Ikeda et al., 2005). Um die transkriptionelle Regulation von zwei weiteren virulenzassozierten Genen des ColV-Plasmids untersuchen zu können, wurden die Promotoren von *iss* und *tsh* zunächst identifiziert und in einen  $\beta$ -Galaktosidase-Expressionsvektor (pRS551) ligiert (Oka et al., 1981). Mit Hilfe des Expressionsvektors konnte die Beeinflussung der Promotoraktivität durch verschiedene Wachstumsbedingungen und Supplemente untersucht werden. Die Serumresistenz vermittelnde und hämagglutinierende Funktion von Iss und Tsh in der Pathogenese von APEC hängt mit dem Übertritt des Bakteriums in den Blutkreislauf des Wirtes zusammen. Computerbasierte Sequenzanalysen der stromaufwärts flankierenden DNS beider Gene ergaben keinen Hinweis auf Bindedomänen für Fur, womit offenbar keine direkte transkriptionelle Bedeutung des globalen Regulators vorliegt. Nichtsdestotrotz ergaben die Regulationsstudien dieser Arbeit eine signifikante Bedeutung von Eisenionen für die Regulation der Expression von *iss*. Etwa 2.000 Iss-Moleküle pro Bakterienzelle werden zur Abwehr des wirtseigenen Komplementsystems in die Zellwand von APEC eingelagert. Aufgrund der Vielzahl benötigter Proteine, ist der *iss*-Promotor deutlich stärker und die Aktivität des Promotors deutlich höher im Vergleich zum *tsh*-Promotor. Wie hoch die Anzahl des Temperatursensitiven Hämagglutinins pro Bakterienzelle ist, ist unbekannt, aber die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf eine sehr viel spezifischere Regulation von wenigen Molekülen hin. Die Supplementation des M9-Mediums mit den natürlichen und synthetischen Eisenchelatoren Hämoglobin und DIP hatten ebenso, wie das Serum starke Aktivitätsminderungen des *tsh*-Promotors zur Folge. Damit ist zu vermuten, dass die Expression des *tsh* nicht durch das Vorhandensein von Blut bzw. Eisenionen reguliert wird. Entsprechend der Funktion von Iss konnte eine der höchsten Aktivitäten des Promotors im Serum nachgewiesen werden. Nicht-hitzeinaktiviertes Serum enthält Hormone, Aminosäuren, Spurenelemente und eine Vielzahl an weiteren unbekannten Inhaltsstoffen. Ob ein spezieller oder mehrere Inhaltsstoffe des Serums eine regulatorische Bedeutung für die Expression von *iss* besitzen ist fraglich. Auch Hämoglobin wirkte, trotz bakterizider Eigenschaften (Bornside et al., 1968), als regulatorisch wirksame Signalsubstanz auf die Promotoraktivität von *iss*. Wie erwartet, hatte das zugesetzte Glykoprotein im Vergleich zu DIP einen stärkeren regulatorischen Effekt, was darauf hindeutet, dass nicht nur die reine Verfügbarkeit von Eisenionen eine Rolle spielt.

Entgegen den Expressionsuntersuchungen von Skyberg und Kollegen, ergaben die  $\beta$ -Galaktosidasetests dieser Arbeit eine deutliche Aktivitätssteigerung der Promotoren von *iss* und *tsh* in LB-Medium bei höheren Wachstumstemperaturen (37 °C). Obwohl beide Studien in ihrer Bedeutung des Serums für die Expression von *iss*, ebenso wie in der fehlenden Bedeutung von Eisenionen für die Regulation von *tsh* übereinstimmen, konnte in der qualitative Real-time-PCR für alle plasmidcodierten, virulenzassoziierten Gene in LB-Medium nur eine Basalexpression nachgewiesen werden (Skyberg et al., 2008). Da die Intensionen beider Versuche allerdings grundverschieden sind, ist ihre Vergleichbarkeit auch nicht ohne weiteres möglich. Während die Studien von Promotoren in Expressionsvektoren eher der Erforschung ihrer Aktivitätsverläufe unter dem Einfluss spezifischer Metaboliten dienen, geht aus der Veröffentlichung von Skyberg et al. nicht hervor, zu welchem Zeitpunkt des bakteriellen Wachstums in LB- und den anderen Medien (humaner Urin und Hühnerembryonen) die Real-time-PCR durchgeführt und welcher Wert für die Basalexpression ermittelt wurde. Die Untersuchungen mittels  $\beta$ -Galaktosidase-Assays sind seit langem bekannt und etabliert, so dass auf die bereits bekannten Probleme dieser Methode auf unterschiedliche Weise begegnet werden konnte. Verfälschungen der Ergebnisse durch Anhäufung der  $\beta$ -Galaktosidase innerhalb der Bakterienzelle während des Wachstums über Nacht konnten durch die Verwendung frisch angezogener Inokula (bis OD<sub>600</sub> 1) verhindert werden. Eine erhöhte Basalexpression des blockierten *lac*-Promotors infolge der Kohlenhydrat-Konzentration im LB-Medium, wurde durch mitgeführte Negativ-Kontrollen (IlnpRS) ausgeschlossen. Die Basalexpression des Vektors wurde unter allen Wachstumsbedingungen mit ermittelt und von den Aktivitäten der untersuchten Promotoren herausgerechnet. Nicht ganz ausgeschlossen werden kann allerdings die Möglichkeit, dass die Insertionsmutation des Suizidvektors pGP704 im Strukturgen von LacZ einen pleiotrophen Effekt auf die IMT5155-Mutante hatte. Die Versorgung bakterieller Zellen mit Kohlenstoff ist elementar und hat weitreichende genregulatorische Auswirkungen innerhalb der Zelle. Möglich wäre auch, dass die Insertion und Relokalisation der gekoppelten Genabschnitte von p1ColV<sub>5155</sub> ein gegenüber pAPEC-O2-ColV [Acc. NC\_007675] verändertes Aktivitätsverhalten der Promotoren von *tsh* und *iss* aufweist. Nichtsdestotrotz bleibt es sehr wahrscheinlich, dass die hohe Körpertemperatur (42 °C) des Huhns im Zusammenhang mit einem veränderten Nährstoffangebot zu transkriptionellen Veränderungen innerhalb der Bakterienzelle führt, was durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt wurde. Damit APEC Übergänge zwischen den verschiedenen Habitaten wahrnehmen können, braucht es aber noch eine Vielzahl weiterer bakterieller Transkriptionsfaktoren, die durch Bindung spezifischer



Metaboliten Veränderungen in der transkriptionellen Genregulation bedingen. Für die Expression von *iss* spielen offenbar die Inhaltsstoffe des Serums und das Hämoglobin eine zusätzliche regulatorische Rolle. Welcher Transkriptionsregulator abhängig von der Verfügbarkeit von Eisenionen eine Rolle für die Expression von *iss* spielen könnte, ist rein spekulativ. Forschungsergebnisse der letzten Jahre haben deutlich gemacht, dass kurze RNS-Sequenzen (small RNAs) wichtige Regulatoren darstellen. Über 1.000 verschiedene RNS-Moleküle in der Bakterienzelle inhibieren oder stimulieren die Translation von Proteinen. Bei vielen Regulons der bakteriellen Stressantwort spielen kurze RNS-Sequenzen eine wesentliche Rolle. RhyB z. B. ist eine 90 bp lange RNS, die die Expression einer Vielzahl eisenspeichernder oder nutzender Proteine bei *E. coli* infolge von Eisenmangel herunter reguliert. Ein solcher Regulator könnte auch auf die Expression von *iss* Einfluss nehmen (Gottesman et al., 2006; Masse et al., 2003; Masse & Gottesman, 2002). Welche Signale zusätzlich zu einer hohen Temperatur und der Verfügbarkeit von Kohlenstoff bei der transkriptionellen Regulation von *tsh* eine Rolle spielen, konnte nicht verifiziert werden.

### 3.4 Bedeutung der ColV-Plasmide für die Virulenz von APEC-Stämmen

Die Frage nach der Bedeutung der Colicin V-codierenden Plasmiden für die Virulenz von APEC-Stämmen ist nicht so eindeutig zu beantworten, obwohl diese in der Literatur häufig als „Virulenzplasmide“ bezeichnet werden. Wesentliche Grundvoraussetzungen für die Einordnung der ColV-Plasmide als „Virulenzplasmide“ betreffen ihre Größe, ihre konjugative Verbreitung und der Nachweis einer Reihe verschiedener Gene, die im herkömmlichen Sinne als virulenzassoziierte Faktoren (Antibiotikaresistenz, Adhäsine, Toxine, Eisenaufnahmesysteme und Mechanismen zur Wirtsabwehr) gelten und in genetischen Inseln (GEIs) auf dem Plasmid organisiert sind (Girardeau et al., 2003; Achtman et al., 1986; Achtman et al., 1983). Der Nachweis der mit den GEIs assoziierten genetischen Faktoren findet in deutlich höherem Umfang bei APEC-Isolaten als bei aviären kommensalen *E. coli*-Stämmen statt (Chlosta et al., 2006). Trotzdem sind die aufgezeigten Ergebnisse der Beweisführung für eine plasmidvermittelte Virulenz einzelner Loki im Abschnitt 3.2 uneinheitlich und stellen damit ihre Bedeutung für die Virulenz des APEC-Pathotyps in Frage. Eine Relevanz der bereits charakterisierten, plasmidcodierten Faktoren scheint vielmehr wesentlich an das Vorhandensein von chromosomal determinierten Virulenzfaktoren gekoppelt zu sein. Inwiefern die Vielzahl der unbekannten offenen Leserahmen des ColV-Plasmids virulenzassoziierte Funktionen aufweisen ist ebenso fraglich, wie die einzelner bereits bekannter Faktoren. Das aviäre Hämolysin (HlyF) z. B. ist ein neuer Hämolysintyp, der zuerst in einem aus Geflügel isolierten *E. coli*-Stamm nachgewiesen wurde (Chlosta et al., 2006;

Morales et al., 2004). Hämolsine sind zytolytische Toxine, die auf die eukaryotische Zytoplasmamembran einwirken und den Zelltod hervorrufen. Sie greifen Phospholipide oder Stearine der Zytoplasmamembran an und gehören aufgrund eines spezifischen Motivs in der DNS-Sequenz in den meisten Fällen zu der Gruppe der RTX („repeats in toxins“)-Hämolsine. Die Bedeutung des Hämolsins HlyF für APEC ist noch völlig unklar, da es offenbar nicht die Lysis roter Blutkörperchen hervorrufen kann und die DNS-Sequenzanalyse des Gens keine Ähnlichkeit zu den RTX-Hämolsinen aufgezeigt hat, sondern zu *sheA*. Hierbei handelt es sich um das Gen eines Hämolsins aus einem *E. coli* K12-Stamm, das nur bei hoher intrazellulärer Kopienzahl des Proteins eine Hämolyse von Erythrozyten hervorrufen kann (Reingold et al., 1999). Da das Gen von HlyF bisher nur auf hochmolekularen Plasmiden mit geringer Kopienzahl nachgewiesen wurde (bei APEC auf p1ColV<sub>5155</sub>, pAPEC-O1-ColBM [Acc. DQ381420] und pAPEC-O2-ColV [Acc. NC\_007675], bei UPEC auf p1658/97 [Acc. AF550679]) (Zienkiewicz et al., 2007; Chlost et al., 2006; Johnson et al., 2006b) wird die Expression des Proteins während der Pathogenese entweder spezifisch hoch reguliert oder es besitzt eine andere Funktion als ursprünglich beschrieben. Auch die beiden ursprünglich bei pflanzenpathogenen Stämmen beschriebenen ABC-Transporter *etsABC* und *eitABCD* sind in ihrer Funtionalität für APEC noch nicht charakterisiert.

Obwohl die Virulenzassoziation einzelner Loki des ColV-Plasmids häufig nicht eindeutig geklärt ist, gibt es plasmidcodierte Eigenschaften, die typischerweise mit dem durch APEC verursachten Krankheitsbild der Colibakteriose verbunden sind (Kariyawasam et al., 2006b; Tivendale et al., 2004; Dozois et al., 2002). Eine durch APEC verursachte Bakteriämie ist nur mit dem zusätzlichen plasmidcodierten, eisenakquirierenden System Aerobaktin bei gleichzeitiger Vermeidung der wirtsspezifischen Immunantwort durch Iss möglich (Johnson et al., 2003a; Whittam et al., 1989). Damit kommt den Colicin-codierenden Plasmiden, ähnlich den hochmolekularen Plasmiden einiger invasiv pathogener Stämme (*Yersina spp.*, *S. enterica ssp. enterica* und *Shigella spp.*) eine Assoziation mit der Virulenz zu, wobei die daraus resultierende Pathogenität für die jeweiligen intestinalen bzw. extraintestinalen Stämme anscheinend differiert. Die SVPs („Salmonella virulence plasmids“) von *Salmonella enterica ssp. enterica* der Serovare Enteritidis, Typhimurium, Dublin, Choleraesuis, Gallinarum, Pullorum und Abortusovis codieren alle die zum Überleben des Bakteriums in Makrophagen wichtigen Gene *spvRABCD* und abhängig von dem Serovar weitere virulenzassoziierte Faktoren (Rychlik et al., 2006). Mit dem Verlust des Plasmids verringert sich die Virulenz des Stammes, die mit Rückführung eines beliebigen Plasmids

aller Serovare wieder herzustellen ist (Montenegro et al., 1991; Barrow & Lovell, 1989). Vergleichende Untersuchungen von Ginns und seiner Arbeitsgruppe an einem 95 kb großen ColV-Plasmid (pVM01; [Acc. NC\_010409]) eines APEC-Stammes (E3) haben ein zu den enteropathogenen SVPs uneinheitliches Ergebnis gebracht (Ginns et al., 1998). Der Verlust des Plasmids hatte eine Reduktion der Virulenz des APEC-Stammes (E3/1.1) zur Folge, sofern die Bakteriensuspension in den Luftsack injiziert wurde. Der konjugative Transfer eines genetisch ähnlichen, Aerobaktin codierenden und Serumresistenz vermittelnden Plasmids eines anderen aviären pathogenen *E. coli*-Stammes (Ike et al., 1992) hatte nach intratrachealer Injektion und nachfolgender Bestimmung der LD<sub>50</sub> die Wiederherstellung und damit die Notwendigkeit des Plasmids für eine vollständige Virulenz bestätigt und entsprach damit zunächst den Ergebnissen der intestinal Pathogenen (Ginns et al., 2000). Dieser Versuch hatte andere Ergebnisse zur Folge, sobald der APEC-Wildtyp (E3) und die plasmidfreie Mutante (E3/1.1), dem natürlichen Infektionsweg nachempfunden, als Bakterienaerosole ( $10^{10}$ - $10^{11}$  KBE/ml) vernebelt und durch einen Tag alte Hühner (n = 15) über Inhalation aufgenommen wurden. Interessantweise war bereits die Mortalitätsrate des Wildtyps sehr gering (2/15), so dass das Fehlen des Plasmids keinen wesentlichen Unterschied in der Letalität der Tier zur Folge hatte. Lediglich die bakteriell vermittelte Rate an Läsionen des Lungenepithels zeigte eine deutliche Abnahme bei der Mutante (1/15) (Ginns et al., 1998). Auch bei Versuchen mit *Salmonella enterica ssp. enterica*-Stämmen ist für die Virulenz der Stämme der Infektionsweg von Bedeutung. Allerdings haben Untersuchungen an Typhimurium die virulenzdeterminierende Rolle der SVPs nach oraler, intraperitonealer als auch subkutaner Infektion bestätigt und sich sogar auf den *spv*-Lokus alleine zurückführen lassen, der für die Pathogenese entscheidend ist. Die re-Transformation eines SVP-deletierten *Salmonella enteric ssp. enterica*-Stammes mit dem *spv*-Lokus in einem Expressionsvektor mit geringer Kopienzahl reichte aus, um die Virulenz des Stammes wieder vollständig herzustellen. Ob dem Aerobaktin oder Iss eine ähnlich ausschlaggebende Bedeutung für die Virulenz des APEC-Stammes zukommt, wurde so noch nicht untersucht.

Verschiedene Multiplex-PCRs von chromosomal lokalisierten Genen bei APEC wie Fimbrien (*papC*, *fimC*), Curli (*csgA*) und dem äußeren Membrantransporter A (*ompA*) konnten ebenso, wie die Gene des ColV-Plasmids (*cva/cvi*, *iss*, *tsh*, *traT*, *iucD*, *iro* und *sitD*) im Beispiel von sechs aviären *E. coli*-Stämmen nachgewiesen werden, die aus dem Kot von Hühnern und der Stallluft isoliert worden waren. In diesen apathogenen Isolaten traten zwischen 6-14 virulenzassoziierte Gene des Plasmids und Chromosoms auf, von denen drei der Isolate im *in vivo* Versuch mit fünf Wochen alten Hühnern untersucht und keine klinische Manifestation

verursachten (Ewers et al., 2007). Die Sektion der infizierten Tiere ließ bei der Betrachtung der inneren Organe (Lunge, Herz, Niere, Milz) ähnlich der p1ColV<sub>5155</sub>-Transformante nur eine, vermutlich durch die Reaktion des Immunsystems hervorgerufene Gewebeschädigung erkennen. Die mit Druck eingebrachte hohe Konzentration an apathogenen Bakterien könnte durch direkte Schädigung des kranialen Lufsystems oder infolge einer erleichterten Überwindung der Lücken zwischen den Epithelzellen in die Blutgefäße übergetreten sein und dort infolge der Einwirkung von Entzündungsnoxen Veränderungen hervorgerufen haben. Die Veränderungen an den Gefäße bedingen wiederum eine verstärkte Aktivität phagozytierender Zellen des Blutes (Makrophagen und Neutrophile), die durch Opsonierung oder chemotaktische Esterasen angelockt werden und zu Gewebeläsionen führen, wodurch weitere Bakterien ins Blut gelangen können (Madigan et al., 2001). Möglicherweise ist das der Grund, weshalb die apathogenen *E. coli*-Stämme in der besonders filteraktiven Niere nachgewiesen werden konnten, obwohl die Bakterienzahl bereits drastisch reduziert war. Diese Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass die aviären apathogenen *E. coli*-Isolate ebenfalls typische virulenzassoziierte Faktoren der APEC aufweisen, Art und Anzahl der Faktoren jedoch nicht ausreichen, um den extraintestinalen Lebensraum des Wirtes nutzen zu können. Keines der apathogenen aviären Isolate wies die Genkombinationen von IMT5155 auf, da einige Gene gar nicht oder nur in einigen Ausnahmen nachgewiesen werden konnten (z. B. die Gene der K1-Kapsel, der GimB-Insel, des vakuolisierenden Autotransporter-Proteins etc.). In der Literatur werden diese Stämme häufig als Zwischenstufen in der evolutionsbiologischen Entwicklung von Pathogenen diskutiert. Aber ähnlich den apathogenen *E. coli*-Isolaten, die virulenzassoziierte Faktoren codieren und kein klinisches Erscheinungsbild zur Folge haben, treten auch innerhalb des APEC-Pathotyps Stämme auf, bei denen die Vielzahl virulenzassoziierter Faktoren nicht mit einer Zunahme an bakterieller Virulenz korreliert (Johnson et al., 2007b). In APEC-O1 [Acc. NC\_008563] konnten mit 28 virulenzassozierten Genen deutlich mehr Faktoren als bei anderen APEC-Stämmen nachgewiesen werden. Entgegen der hohen Anzahl virulenzassoziierter Faktoren war der Stamm im Embryoletalitätstest aber deutlich weniger virulent als andere Isolate, mit geringerer Faktoranzahl (Johnson et al., 2007b). Infektionsversuche mit IMT5155, der bis auf *cdtB* alle anderen von APEC-O1 [Acc. NC\_008563] und mit der RPAI (*malX*) noch weitere virulenzassoziierte Faktoren aufweist, hatten immer auch das Auftreten äußerlich gesunder Tiere bzw. die Anwendung höherer Infektionsdosen für die Induktion eines septikämischen Krankheitsgeschehens zur Folge. Nicht nur APEC, UPEC und NMEC, sondern auch apathogene aviäre *E. coli* können damit genetische Determinanten aufweisen, die

übergreifend in ExPEC, als auch spezifisch in nur einer Gruppe nachzuweisen sind (Ron, 2006). Die Übereinstimmung der genetischen Determinanten legt die Vermutung nahe, dass diese auf die Besiedelung derselben „ökologischen Nische“ zurückzuführen sind. Bedingungen, die innerhalb dieser Nische vorherrschen machen genetische Übereinstimmungen bzw. Funktionsähnlichkeiten von Proteinen notwendig, die ein Überleben und in letzter Konsequenz auch eine Verbesserung der Fitness unter diesen Bedingungen ermöglichen sollen. Genetische Inseln, die durch mobile Elemente flankiert sind und nützliche Gene für eine spezifische Umgebung tragen, sind deshalb häufig bei pathogenen wie nicht-pathogenen Mikroorganismen des gleichen Habitats nachzuweisen (Hacker & Kaper, 2000). Diese Inseln werden entsprechend ihres Beitrags an der Lebensweise des Mikroorganismus verschieden bezeichnet. GEIs, die virulenzassoziierte Faktoren codieren, bezeichnet man als „Pathogenitätsinseln“ (PAIs) genauso, wie es ökologische (ECIs), symbiontische (SAIs), saprophytische (SYIs) und Antiinfektiva-Resistenzen vermittelnde (ARIs) Inseln gibt (Hochhut et al., 2006; Dobrindt et al., 2004; Hacker & Carniel, 2001). Die Einordnung der Inseln ist i. d. R. nicht eindeutig möglich, da ihre Funktionen bei unterschiedlichen Subtypen differieren bzw. sie duale Rollen umfassen können. Die HPI von *Yersinia spp.* z. B. kommt bei vielen pathogenen und auch nicht-pathogenen Stämmen der *Enterobacteriaceae* vor. Es gibt Beispiele, wonach diese Insel in fäkalen *E. coli* als PAI, bei *Klebsiella spp.* als ECI und bei *Salmonella enterica ssp. enterica* als SAI eingestuft wird (Oelschlaeger et al., 2003; Bach et al., 1999; Schubert et al., 1998). Ähnlich verhält es sich mit dem Typ III-Sekretionssystem, das bei vielen pathogenen Mikroorganismen in PAIs codiert vorliegt und die Verbindung zwischen bakterieller und eukaryotischer Zellen erzwingt (EHEC, EPEC, *S. enterica ssp. enterica*, *Shigella spp.*, *Yersinia spp.* und verschiedene Pflanzenpathogene). Bei dem Stickstoff-fixierenden, gram-negativen Bakterium *Sinorhizobium fredii* wird das Typ III-Sekretionssystem als SAI eingeordnet. Als GEIs mit dualer Funktion werden auch Siderophoren und Adhäsine eingestuft. Eisenakquirierende Systeme werden unter Mangelbedingungen der Umwelt als Fitness-Faktoren angesehen (Ravatn et al., 1998; Sullivan & Ronson, 1998; Hochhut et al., 1997). Im Wirt bedeutet ihr Auftreten hingegen die Expression zusätzlicher virulenzassoziiierter Faktoren. Fimbrielle Adhäsine der P- und S-Familie konnten bei kommensalen *E. coli*-Stämmen nachgewiesen werden, die deren Kolonisierung des Darmtraktes ermöglichen. Wenn diese Stämme in sterile extraintestinale Räume wie z. B. den Urogenitaltrakt eintreten und dort durch Kolonisierung zur Ausbildung einer Harnwegsinfektion führen, wird die das Adhäsine codierende GEI als PAI eingestuft, obwohl

sie nicht zur Besiedelung einer neuen ökologischen Nische und damit als neue virulenzassoziierte Region aufgenommen worden ist (Hochhut et al., 2006).

MLST-Untersuchungen und vergleichende DNS-DNS-Hybridisierungen mit dem variablen genetischen Pool der phylogenetischen Gruppe B2 von 60 *E. coli*-Isolaten verschiedener ExPEC haben im Zusammenhang mit einer Quantifikation der extraintestinalen Virulenz der verschiedenen Isolate zu der Vermutung geführt, dass die Pathogenität der gesamten ExPEC-Pathogruppe nur ein zufälliges Nebenprodukt des Kommensalismus ist (Le Gall et al., 2007). Bezogen auf die Virulenz von APEC lässt sich resümieren, dass a) die Virulenz von APEC *in vivo* mit  $10^9$  KbE/ml Bakterien verabreicht, nicht in jedem Fall ein klinisches Erscheinungsbild zur Folge haben muss, b) eine hohe Morbidität entweder bei jungen Tieren nachzuweisen ist, deren maternaler Impfschutz nur gering bzw. überhaupt nicht mehr vorhanden ist oder aber bei Legehennen (ab der 20-igsten Lebenswoche), deren Immunantwort in Vorbereitung auf die Eiproduktion eine Schwächung erfährt und c) die Mortalitätsrate der APEC-Infektion wesentlich durch das Auftreten von Primärinfektionen oder anders gerartetem Stress (wenig Bewegungsfreiheit, hohe Temperaturen, schlechte Luftqualität etc.) beeinflusst wird. Dies legt die Vermutung nah, dass eine APEC-Infektion mit nachfolgender Erkrankung wesentlich durch Immunantwort des Tieres mitbestimmt wird. Die Schwächung des gesamten Organismus bei gleichzeitiger Entzündungsreaktion des epithelialen Gewebes zur Abwehr des Erregers bewirkt vermutlich die Entstehung einer Eintrittspforte für das Bakterium. Mit dem Übertritt der APEC in den extraintestinalen Bereich des Huhnes bedingen die verschiedenen Siderophoren und Transportsysteme, die in der Umwelt und im Intestinaltrakt mit einer verbesserten Fitness assoziiert waren, zusammen mit weiteren plasmid- (z. B. Serum- und Antibiotikaresistenz, erhöhte Tenazität in Makrophagen) und chromosomal (z. B. Adhäsion, Invasion) codierten Eigenschaften ein pathogenes Auftreten. Damit vermitteln die Faktoren der ColV-Plasmide den jeweiligen ExPEC-Stämmen einen entscheidenden evolutionären Vorteil bei der Besiedelung sowohl der Umwelt, als auch intestinaler und extraintestinaler Bereiche von Säugetieren und Vögeln.

## 4 Material

Tab. 5 Wildtypstämme

Stamm	Isolat	Herkunft Relevante Eigenschaften	Referenz/ Quelle
IMT5104	A <sub>fecal</sub>	Huhn; Keimisolat aus klinisch gesundem Tier	18d; Tierärztl. UA Heidelberg
IMT5155	APEC	Legehenne; septikämisches Krankheits-geschehen; Serotyp (O2:K1:H5)	LTZ
M00D01	APEC	IMT5155NaI <sup>R</sup> <i>traG</i> ::Tn5 <i>km2</i>	(Li et al., 2005)
M00F07	APEC	IMT5155NaI <sup>R</sup> <i>f07</i> ::Tn5 <i>km2</i>	(Li et al., 2005)
IMT2111	APEC	Legehenne; Septikämisches Krankheitsgeschehen; Serotyp (O1:H15)	Einsender, IMT FU Berlin
IMT6483	A <sub>fecal</sub>	Huhn, Keimisolat aus klinisch gesundem Tier	LTZ F970/02Wu3
IMT6487	A <sub>fecal</sub>	Huhn, Keimisolat aus klinisch gesundem Tier Wildtyp	LTZ F905/02-21
IMT10666	A <sub>environ</sub>	Luftprobe aus dem Hühnerstall, Bodenhaltung (Umweltprobe)	L/1; Institut für Tierhygiene
IMT10674	A <sub>environ</sub>	Luftprobe aus dem Hühnerstall, Bodenhaltung (Umweltprobe)	P/5; Institut für Tierhygiene
IMT10676	A <sub>environ</sub>	Luftprobe aus dem Hühnerstall, Bodenhaltung (Umweltprobe)	V/7; Institut für Tierhygiene
IMT10718	A <sub>fecal</sub>	Huhn, 39. Woche; Kloakentupfer	602-9 LTZ
IMT10740	A <sub>environ</sub>	Luftprobe aus dem Entenstall, (Umweltprobe)	7m; Institut für Tierhygiene
2363	APEC	Referenzstamm, ColV codierendes Plasmid (pTJ100)	(Wooley et al., 1994)
SL1344	<i>S. enterica</i>	Referenzstamm (NC_003198)	(Parkhill et al., 2001)
IHE 3034	NMEC	Mensch, O18ac:K1:H7	IMIB
IHE 3036	NMEC	Mensch, O18ac:K1:H7	IMIB
IHE 3080	NMEC	Mensch, O18ac:K1:H7	IMIB
BK 658	NMEC	Mensch, O75:K1:H7	IMIB
B 10363	NMEC	Mensch, möglicherweise K1	IMIB
B 13155	NMEC	Mensch, möglicherweise K1	IMIB
VE 239	NMEC	Mensch, K1	IMIB
VE 1140	NMEC	Mensch, K1	IMIB
E 817	NMEC	Mensch, O6:K2	IMIB
E 247	NMEC	Mensch, O6:K15	IMIB

LTZ: Lohmann Tierzucht GmbH, IMIB: Institut für Medizinische Infektionsbiologie

Fortsetzung Tab. 5 Wildtypstämme

Stamm	Isolat	Herkunft Relevante Eigenschaften	Referenz/ Quelle
RS218	NMEC	Mensch, O18ac:K1:H7	IMIB
RS176	NMEC	Mensch, O7:K1:H-	(Achtman et al., 1983)
C183-77	NMEC	Mensch, O7:K:-H-	(Achtman et al., 1983)
IHE3055	NMEC	Mensch, O18:K1	(Achtman et al., 1983)
BE1-2928	NMEC	Mensch, O1:K1:H7	(Achtman et al., 1983)
RS179	NMEC	Mensch, O1:K1:H7	(Achtman et al., 1983)
CFT073	UPEC	Referenzstamm (NC_004431)	(Welch et al., 2002)
9285	UPEC	Mensch	Labor Dr. Enzenauer; Osnabrück
9286	UPEC	Mensch	Labor Dr. Enzenauer; Osnabrück

IMIB: Institut für Medizinische Infektionsbiologie

Tab. 6 Rekombinante *E. coli*-Stämme

Stamm	Isolat	Relevante Eigenschaften	Referenz/ Quelle
ATCC 23558	<i>E. coli</i> K12	<i>cvicvaABC</i>	(Wooley et al., 1994)
ATCC 23559	<i>E. coli</i> K12	$\Delta cvicvaABC$	(Wooley et al., 1994)
DH5	<i>E. coli</i> K12	F <sup>+</sup> $\Phi 80dlacZ\Delta(lacZYAargF)U169recA1endA1hsdR17(r_K-m_K^+)supE44\lambda^-$	(Raleigh et al., 1988)
MG1655	<i>E. coli</i> K12	F <sup>-</sup> $\lambda^-$	(Bachmann, 1990)
p1D01K	<i>E. coli</i> K12	DH5-Transformante mit p1D01	Diese Arbeit
p1F07K	<i>E. coli</i> K12	DH5-Transformante mit p1F07	Diese Arbeit
Iln	APEC	IMT5155Cm <sup>R</sup> <i>lacZ::pGP704</i>	(Li et al., 2005)
IlnpRS	APEC	pRS551 transformiert in Iln	Diese Arbeit
IlnpP1	APEC	p1RS transformiert in Iln	Diese Arbeit
IlnpP2	APEC	p2RS transformiert in Iln	Diese Arbeit
KT2442	<i>E. coli</i> K12	MG1655 $\Delta(lacIZ)rph^+$	(Cashel et al., 1996)



Fortsetzung Tab. 6 Rekombinante *E. coli*-Stämme

Stamm	Isolat	Relevante Eigenschaften	Referenz/ Quelle
KTpRS	<i>E. coli</i> K12	KT2442 mit pRS551-Expressionsvektor	Diese Arbeit
KTpP1	<i>E. coli</i> K12	KT2442 mit p1RS	Diese Arbeit
KTpP2	<i>E. coli</i> K12	KT2442 mit p2RS	Diese Arbeit
1017	<i>E. coli</i> K12	HB101 <i>ent::Tn5</i> , Km <sup>R</sup>	(Daskaleros et al., 1991)
1017cB27	<i>E. coli</i> K12	1017-Transformante mit Cosmidklon B27	Diese Arbeit
1017cD27	<i>E. coli</i> K12	1017-Transformante mit Cosmidklon D27	Diese Arbeit
1017cD34	<i>E. coli</i> K12	1017-Transformante mit Cosmidklon D34	Diese Arbeit
1017cF44	<i>E. coli</i> K12	1017-Transformante mit Cosmidklon F44	Diese Arbeit
TOP 10	<i>E. coli</i> K12	F <i>mcrA</i> Δ( <i>mrrhsdRMSmcrBC</i> )φ80Δ <i>lac</i> ZM15C <i>lacX74recA1deoRaraD139</i> Δ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galUgalK</i> rpsL(Str <sup>R</sup> ) <i>endA1nupG</i>	(Shuman, 1994)
JC9387	<i>E. coli</i> K12	F <sup>+</sup> <i>thraraCleuB6DE(gptproA)lacYsbcts</i> <i>x<sup>-</sup>qsr<sup>-</sup>galK2LAMRacsbcbhisGrfbC</i> <i>recBrecCrpsLNBkdgKxylAmtl<sup>-</sup>argEthi<sup>-</sup></i>	(Barbour et al., 1970)

Tab. 7 Native Plasmide

Plasmid	Relevante Eigenschaften	Referenz/ Herkunft
p1ColV <sub>5155</sub>	~ 180 kb großes ColV-produzierendes Plasmid aus dem APEC-Wildtyp IMT5155	Diese Arbeit
p2 <sub>5155</sub>	~ 4,4 kb großes Plasmid aus dem APEC-Wildtyp IMT5155	Diese Arbeit
pRK100	ColV-Plasmid des UPEC-Stammes KS533	(Ambrozic et al., 1998)
R1	Referenzplasmid für 94 kb	(Bauerfeind et al., 1992; Hughes & Datta, 1983)
R27	Referenzplasmid für 170 kb	(Bauerfeind et al., 1992; Hughes & Datta, 1983)
R478	Referenzplasmid für 251 kb	(Bauerfeind et al., 1992; Hughes & Datta, 1983)
V517	Referenzplasmid für 56; 36; 7,7; 9,5; 4,2; 3,2; 2,9 und 2,2 kb	(Bauerfeind et al., 1992; Hughes & Datta, 1983)

Tab. 8 Rekombinante Cosmide und Plasmide

Cosmide/ Plasmide	Relevante Eigenschaften	Referenz/ Herkunft
p1D01	Aus 5155Nal <sup>R</sup> isoliertes p1ColV <sub>5155</sub> -Plamid mit <i>traG</i> -Insertion ( <i>traG</i> ::Tn5 <sub>km2</sub> )	(Li et al., 2005)
p1F07	Aus 5155Nal <sup>R</sup> isoliertes p1ColV <sub>5155</sub> -Plamid mit <i>f07</i> -Insertion ( <i>f07</i> ::Tn5 <sub>km2</sub> )	(Li et al., 2005)
cB27	<i>SuperCos1</i> -Vektor mit p1ColV <sub>5155</sub> -Insertion; Nachweis von <i>tsh</i> und dem ColV-Operon	IMT FU Berlin, diese Arbeit
cD27	<i>SuperCos1</i> -Vektor mit p1ColV <sub>5155</sub> -Insertion; Nachweis von Aerobaktin	IMT FU Berlin, diese Arbeit
cD34	<i>SuperCos1</i> -Vektor mit p1ColV <sub>5155</sub> -Insertion; Nachweis des Sit-Operons	IMT FU Berlin, diese Arbeit
cE5	<i>SuperCos1</i> -Vektor mit p1ColV <sub>5155</sub> -Insertion; Sequenzhomologie zu pU302L	IMT FU Berlin, diese Arbeit
cF44	<i>SuperCos1</i> -Vektor mit p1ColV <sub>5155</sub> -Insertion; Nachweis von <i>iss</i> und Salmochelin	IMT FU Berlin, diese Arbeit
pP1	β-Galaktosidase-Expressionsvektor pRS551, <i>lacIZ</i> -Strukturgene unter der Kontrolle von P1 (Promotor von <i>tsh</i> )	Diese Arbeit
pP2	β-Galaktosidase-Expressionsvektor pRS551, <i>lacIZ</i> -Strukturgene unter der Kontrolle von P2 (Promotor von <i>iss</i> )	Diese Arbeit

Tab. 9 Vektoren

Vektor	Relevante Eigenschaften	Referenz/Quelle
pUC19	Klonierungsvektor (Amp <sup>R</sup> )	(Jerse et al., 1990)
pRS551	β-Galaktosidase-Expressionsvektor (Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> ) mit promotorlosen <i>lacIZ</i> -Strukturgenen	(Oka et al., 1981)
pCR®2.1-TOPO	Klonierungsvektor (Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> )	(Shuman, 1994)
SuperCos1	Vektor zur Erstellung von Genbanken; Aufnahme von ~ 30 kb Fremd-DNS	(Stratagene; Artikel-Nr.:251301)
pACYC184	p15A Replikon (Cm <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> )	(Rose, 1988)
pGP704	Suicide-Plasmid (Amp <sup>R</sup> )	(Miller & Mekalanos, 1988)
pGP704 <i>lacYZ</i>	pGP704 Derivat mit <i>lacYZ</i> -Fragment	(Li et al., 2005)

Tab. 10 Eukaryotische Zellen

Zellen	Relevante Eigenschaften	Herkunft
J774	Tumormakrophagen-Zelllinie der Maus	IMT FU Berlin, DSM
CEC-32	Permanente Wachtelfibroblasten	IMT FU Berlin

Tab. 11 Oligonukleotid-Primer

Name	Primer-Sequenz 5' - 3'-Richtung	Zielregion	T <sub>m</sub> (°C)	Ref.
cvi_cvaC	GAGCTGTTTGTAGCGAAGCC	Überlappender Primer im ColV-Operon	59	IMT
cvaA_ cvaB	TGGTAGAATGTGCCAGAGCAAG	Überlappender Primer im ColV-Operon (Amplifikat: 1180 bp)		
cviS	TCCAAGCGGACCCCTTATAG	Immunitätsprotein des ColV-Operons – Sonde	58	C. Ewers IMT
cvaS	CGCAGCATAGTTCCATGCT	Strukturgen für Colicin V – Sonde (Amplifikat: 598 bp)		
tsh.FP <sub>(132)</sub>	ACTATTCTCTGCAGGAAGTC	Temperatursensitives Hämagglutinin; Lage im <i>orf</i> (132-151 bp)	55	C. Ewers IMT
tsh.RP <sub>(955)</sub>	CTTCCGATGTTCTGAACGT	Temperatursensitives Hämagglutinin; Lage im <i>orf</i> (936-955 bp)		
iss cdsfw	ATGCAGGATAATAAGATGAAA	Serumresistenz vermittelndes Protein; Lage im <i>orf</i> (1-21 bp)	50	C. Ewers IMT
iss cdsrv	CTATTGTGAGCAATATACC	Serumresistenz vermittelndes Protein; Lage im <i>orf</i> (290-309 bp)		
iucD.fp	ACAAAAAGTTCTATCGCTTCC	Aerobaktin-Operon, Biosyntheseprotein-Strukturgen	55	C. Ewers IMT
iucD.rp	CCTGATCCAGATGATGCTC	Aerobaktin-Operon, Biosyntheseprotein-Strukturgen (Amplifikat: 710 bp)		
traD.fw	CAAATACTCTGATCTCGATG	Komplementresistenz vermittelndes Protein (1390-1409 bp)	58	Diese Arbeit
traD.rev	CATAACAGCCACCGAACTTA	Komplementresistenz vermittelndes Protein (849-868 bp)		
traT.FP	GTGGTGCGATGAGCACAG	Tra-Operon, Oberflächen-Lipoprotein; Lage im <i>orf</i> (62-79 bp)	58	C. Ewers IMT
traT.RP	TAGTTCACATCTTCCACCATCG	Tra-Operon, Oberflächen-Lipoprotein; Lage im <i>orf</i> (491-470 bp)		
sitD.fp	ATCGTGCTTGCCCTGGATTCTG	Protein des ABC-Transporters (163-183 bp)	55	C. Laternus IMT
sitD.rp	TGCTGGTAACGGCAAACGTC	Protein des ABC-Transporters (783-802 bp)		

Fortsetzung Tab. 11 Oligonukleotid-Primer

Name	Primer-Sequenz 5' - 3'-Richtung	Zielregion	T <sub>m</sub> (°C)	Ref.
iroE.fp	TTCGATCTCAACAGCAGGG	Salmochelin-Operon; Hydrolasefkt. (373-391 bp)	46	C. Laturnus IMT
iroE.rp	AGGAGTGCCCCCATAAGC	Salmochelin-Operon; Hydrolasefunktion (551- 568 bp)		
iroN.FP (16)CFT iroN.RP (862)CFT	ATCCTCTGGTCGCTAACTG CTGCACTGGAAGAACTGTTCT	Rezeptor des Salmochelins; Lage im <i>orf</i> (16-34 bp) Rezeptor des Salmochelins; Lage im <i>orf</i> (862-841 bp)	55	C. Ewers IMT
GSP1 <sub>tsh</sub>	TCTGTCACCAGTTTATCCAG	<i>tsh</i> -spezifische Primer für die 5' RACE; Lage im <i>orf</i> (494-475 bp)	55	Diese Arbeit
GSP2 <sub>tsh</sub>	AGCACTGAAATCAGGCATAG	<i>tsh</i> -spezifische Primer für die 5' RACE; Lage im <i>orf</i> (312-293 bp)	55	Diese Arbeit
GSP3 <sub>tsh</sub>	TCCTGGCAAACCTCAGATACG	<i>tsh</i> -spezifische Primer für die 5' RACE; Lage im <i>orf</i> (73-54 bp)	58	Diese Arbeit
GSP1 <sub>iss</sub>	AGAGAGGCTTATCACTATG	<i>iss</i> -spezifische Primer für die 5' RACE; Lage im <i>orf</i> [(+91 bp-(+68 bp]	52	Diese Arbeit
GSP2 <sub>iss</sub>	TTGTCCAATTCCCGAAACG	<i>iss</i> -spezifische Primer für die 5' RACE; Lage im <i>orf</i> (159-141 bp)	53	Diese Arbeit
GSP3 <sub>iss</sub>	ATAAGCATTGCCAGAGCG	<i>iss</i> -spezifische Primer für die 5' RACE; Lage im <i>orf</i> (56-39 bp)	55	Diese Arbeit
EcoRI/ tshProm	ctgaattcTCAGCCCGTCCACATTCA	<i>tsh</i> -Promotorsequenz mit 5'-angefügter <i>Eco</i> RI- Schnittstelle	55	Diese Arbeit
BamHI/ tshProm	ctggatccAGCGCTGTAGCGAAGAGAAT	<i>tsh</i> -Promotorsequenz mit 5'-angefügter <i>Bam</i> HI- Schnittstelle	55	Diese Arbeit
EcoRI/ issProm	gtcctgaattcTGAGTACCTACCAAGTCTGA	<i>iss</i> -Promotorsequenz mit 5'-angefügter <i>Eco</i> RI- Schnittstelle	55	Diese Arbeit
BamHI/ issProm	ctggatccTGCCAGAGCGGCAGAAAAT	<i>iss</i> -Promotorsequenz mit 5'-angefügter <i>Bam</i> HI- Schnittstelle	55	Diese Arbeit

#### 4.1 Nährmedien und Anzucht

Alle Nährmedien wurden zuerst in Lösung gebracht, auf ihren pH-Wert eingestellt, mit Aqua bidest. auf 1 l aufgefüllt und anschließend für 15 min bei 121 °C autoklaviert.

Feste Medien enthielten 1,0-1,5 % [w/v] Agar.

Zusammensetzungen pro Liter Aqua bidest.:

##### LB (Lysogeny Broth)-Medium (nach Miller)

10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, pH 7,0 eingestellt mit 1 ml 1 N NaOH

##### Penassy-Medium (Antibiotic Medium 3)

Fertigmedium, siehe Anleitung (Difco)

Das Medium hat folgende Zusammensetzung:

1,5 g Rinderextrakt, 1,5 g Hefeextrakt, 5,0 g Pepton, 1,0 g Dextrose, 3,5 g NaCl, 3,7 g  $K_2HPO_4$ , 1,3 g  $KH_2PO_4$

##### TSB (Tryptic Soy Broth)-Medium

Fertigmedium, siehe Anleitung (Difco)

Das Medium hat folgende Zusammensetzung:

17,0 g pankreatisch verdautes Casein, 3,0 g enzymatisch verdautes Soja, 5,0 g NaCl, 2,5 g  $K_3PO_4$ , 2,5 g Dextrose

##### SOB (Super Optimal Broth)-Medium

20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 8,6 mM NaCl, 2,5 mM KCl

##### SOC (Super Optimal Broth with Catabolite Repression)-Medium

20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 8,6 mM NaCl, 2,5 mM KCl

Nach dem Autoklavieren und Abkühlen des Mediums erfolgte die Zugabe von 20 mM steril filtrierter Glukose und 10 mM  $MgCl_2$

##### Minimalmedium 9 (M9; mit Glukose)

750 ml steriles Wasser wurden mit 200 ml 5 x M9-Salze (pro Liter: 64 g  $Na_2HPO_4 \times 7 H_2O$ , 15 g  $KH_2PO_4$ , 2,5 g NaCl und 5,0 g  $NH_4Cl$ ), 20 ml 20 %-ige Glukose (steril filtriert), 2 ml 1 M  $MgSO_4$  und 0,1 ml 1 M  $CaCl_2$  versetzt und auf 1 l mit sterilem Aqua bidest. aufgefüllt

##### Minimalmedium 9 (M9 mit Glukose); mit reduziertem Phosphat

Siehe Herstellung von M9; Reduktion des Phosphates durch Supplementation mit 0,03 %  $KH_2PO_4$ .

MacConkey-Agar No.3

Fertigmedium, siehe Anleitung (Difco)

Das Medium hat folgende Zusammensetzung:

20 g Pepton, 10 g Laktose, 1,5 g Gallensalz Nr. 3, 5,0 g Natriumchlorid, 0,003 g Neutralrot, 0,001 g Kristallviolett, 10 g Agar No. 1

Chrom-Azurol-S-(CAS) Agar

Um Eisenionen aus dem Silicat des Glases herauszulösen, wurden alle zu verwendenden Glasmaterialien über Nacht in 6 M HCl eingelegt. Anschließend wurde die salzsäurehaltige Lösung entfernt und die Gläser 3 x mit Millipore-Wasser gespült. Agar und Lösungen sind nur mit Millipore-Wasser anzusetzen.

Das Medium hat folgende Zusammensetzung:

10 x M9: 3 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5 g NaCl, 10 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$  in einem Liter Millipore-Wasser lösen.

Chrom-Azurol-S-(CAS)-HDTMA-Lösung: 181,5 g CAS in 150 ml Millipore-Wasser lösen. Zu dieser Lösung 30 ml 1 mM  $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  in 10 mM HCl geben. 218,7 mg HDTMA in Millipore-Wasser lösen und unter Rühren zur CAS-Lösung geben.

Für 1 Liter Agar:

In 450 ml Millipore-Wasser 6 g NaOH und 30,24 g PIPES lösen. Die Lösung auf pH 6,8 einstellen und dann mit 100 ml 10 x M9 und 15 g Agar versetzt wie angegeben autoklavieren. Nach dem Abkühlen des Agars steril filtrierte Casamino-säure- (30 ml) und Glukoselösung (10 ml) unter Rühren zusetzen. Zum Schluss vorsichtig die CAS-HDTMA-Lösung zugeben, Agar gegebenenfalls mit Antibiotika versetzen und in Platten gießen.

Chrom-Azurol-S-(CAS) Flüssigmedium

Siehe Chrom-Azurol-S-(CAS) Agar; ohne Zusatz von Agar-Agar No1.

**4.2 Standardpuffer**1 x TE-Puffer

10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0 mit HCl einstellen ad 1 l Aqua bidest.

50 x TAE-Puffer

200 mM Tris, 50 mM EDTA, 57,1 ml Eisessig ad 1 l Aqua bidest.

10 x TBE-Puffer

80 mM Tris, 8 mM EDTA, pH 7,6 mit 85 % [w/v] Phosphorsäure einstellen, ad 1 l Aqua bidest.

10 x PBS

80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2,4 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,0 mit HCl einstellen ad 1 l Aqua bidest.

### 4.3 Zusätze für flüssige und feste Nährmedien

Stammlösungen verschiedener Antiinfektiva wurden nach Sambrook et al. (Sambrook & Russell, 2001) angesetzt. Flüssige und feste Nährmedien enthielten folgende Endkonzentrationen:

Flüssigmedium Endkonzentration (µg/ml)	Festes Medium Endkonzentration (µg/ml)		Antiinfektiva
30	50	100	Amp
		20	Cm
50	25	50	Kan
		50	Nal
		80	Spm
		80	Stm
15	20	30	Tet

### 4.4 Herstellernachweis

Hersteller verwendeter Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsgegenstände:

ANGEWANDTE GENTECHNOLOGIE GmbH, Heidelberg; AMERSHAM PARMACIA BIOTEC GmbH, Frankfurt am Main; APPLIED BIOSYSTEMS, Darmstadt; BECKMANN INSTRUMENTS GmbH, München; BIOCHROM, Berlin; BIORAD, München; BOEHRINGER, Mannheim; BRAUN BIOTECH INTERNATIONAL, Göttingen; DIFCO, Detroit (USA); EPICENTRE® TECHNOLOGIES, Madison (USA); EPPENDORF, Hamburg; FISHER SCIENTIFIC GmbH, Schwerte; FLUKA, Hannover; GREINER, Solinge; GRÖSSNER GmbH, Hamburg; HYBAI, Garching; HERAEUS, Hanau; HEROLAB, Wiesloch; INTERACTIVA, Ulm; INVITROGEN, Karlsruhe; JULABO, Seelbach; INTERACTIVA, Ulm; KODAK, Rochester (USA); KNICK, Berlin; LEICA, Solms; LGC GENOMICS GmbH, Berlin; LIFE TECHNOLOGIES, Karlsruhe; LIEBHERR, Biberach; MERCK, Darmstadt; MILLIPORE, Eschborn; NEW ENGLAND BIOLABS, Schwalbach; pQLAB BIOTECHNOLOGIE GmbH, Erlangen; PERKIN ELMER, Massachusetts (USA); POLAROID, Dreieich; PROMEGA, Mannheim; QIAGEN, Düsseldorf; OXOID, Wesel; RIEDEL DE HAEHN, Berlin; ROTH, Karlsruhe; ROCHE, Mannheim; SERVA, Heidelberg; SARTORIUS, Göttingen; SIGMA, München; STATAGENE, Amsterdam (Niederlande); THERMO FISHER SCIENTIFIC, Wesel; UNIVERSAL LABORTECHNIK, Leipzig; ZIEGRA, Isernhagen

#### 4.5 Molekular-Gewichtsmarker

$\lambda$ -DNS/*Hind*III-restringiert, Promega (Fragmentgrößen: 0,125-23 kb)

100-bp Leiter, Invitrogen (Fragmentgrößen: 0,1-1,5 kb)

1-kbp Leiter, Life Technologies (Fragmentgrößen: 0,5-12 kb)

$\lambda$ -DNS-Leiter, U-Konkatemere, New England BioLabs (Fragmentgröße: 50-1,0 kb)

#### 4.6 Computerprogramme

Programm	Anbieter
Adobe Photoshop 7,0	Adobe Systems, USA
Advanced Blast 2.0 Pubmed	National Centre of Biotechnology Information (NCBI), USA
HUSAR	<a href="http://genius.embnet.dkfz-heidelberg.de">http://genius.embnet.dkfz-heidelberg.de</a> , Deutschland
Kodon	Applied Maths BVMA, USA
Lasergene 2000	DNASTAR Ltd., USA
Macromedia Freehand MX	Macromedia, USA
Microsoft® Office	Microsoft, USA
Paint Shop Pro 6	JascSoftware, USA
Panther	<a href="http://www.pantherhg.org">www.pantherhg.org</a> , England
Promotor-Suchprogramm	<a href="http://www.fruitfly.org">www.fruitfly.org</a> , England
PHYRE Protein Fold Recognition Server	<a href="http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre">www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre</a> , England
Sigma Plot 8.0	SYSTAT Software, USA



## 4.7 Geräte

Gerät	Firma
Autoklav	Universal Labortechnik
Brutschränke	Heraeus
Eismaschine	Ziegra
Elektrophorese für Agarosegele	Angewandte Gentechnologie Systeme GmbH
EasyjectT Plus EQUIBIO; Elektroporator	peQLab Biotechnologie GmbH
Feinwaage	Sartorius
Fluorometer (DYNA Quant 2000)	Vertrieb: Fisher Scientific GmbH
Gefriertruhen	Liebherr
Geldokumentation, (UV-Transilluminator)	Herolab
Gene Pulser Chef-DR <sup>®</sup> III System	BioRad
Hybridisierungsröhrchen und -öfen	Thermo Hybaid
Kamera (MP4 <sup>+</sup> Instant Camera System)	Polaroid
Konfokales Laserscanning Mikroskop, TCS SP2	Leica
Kühlzentrifuge	Sigma
Leuchttisch mit Thermodrucker (Video Graphic Printer UP 890 CE)	Herolab
Magnetrührer	IKA Labortechnik
pH-Meter, 766 Calimatic	Knick
Pipetten	Eppendorf
Reinstwassersystem Simplicity <sup>™</sup> , 18 Ω cm	Millipore
Spannungsgeräte	BioRad
Schüttelinkubator	Braun Biotech International
Spektralphotometer (Ultrospec <sup>®</sup> 3000 pro)	Amersham Pharmacia GmbH
Sterilbank	Universal Labortechnik
Thermocycler	Applied Biosystems
Thermomixer	Eppendorf
Tischzentrifuge, ohne Kühlung	Eppendorf
Tischzentrifuge, mit Kühlung	Sigma
Ultrazentrifugen für SW40- / JA-10-Rotoren	Beckmann Instruments GmbH
Vortexer	Eppendorf
Waage	Sartorius
Wasserbäder	Julabo

## 5 Methoden

### 5.1 Anzucht von Bakterienstämmen

Die Anzucht der Stämme erfolgte in verschiedenen flüssigen Komplexmedien (LB, SOB und TSB) und in dem Minimal-Medium M9 (mit Glukose), wobei das Verhältnis von Flüssigvolumen zu Kolbenvolumen 1 zu 10 nicht überstieg. Entsprechend der Versuchsbedingungen erfolgte die Inkubation bei 26 °C, 37 °C oder 42 °C auf einem Rotationsschüttler bei 200 U/min.

Die Pelletierung von Bakterien erfolgte bei 6.000 x g für 10 min bei Raumtemperatur in der Tischzentrifuge.

### 5.2 Stammhaltung und Konservierung von Bakterienstämmen

#### Stammhaltung

Die Kulturen wurden ausgehend von einem Glycerinstock (-70 °C) auf LB-Platten ausplattiert, 24 h bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 4 °C gelagert.

#### Konservierung

Zu konservierende Bakterienstämme wurden bei 37 °C in 10 ml LB-Medium auf dem Rotationsschüttler (200 rpm) bis zur spätexponentiellen Phase kultiviert. Anschließend wurde 1 ml der Zellsuspension entnommen, 150 µl Glycerin hinzugefügt und der Stamm bei -70 °C aufbewahrt.

### 5.3 Messung des Wachstumsverlaufs

Für die Ermittlung von Wachstumsverläufen wurden Hauptkulturen aus über Nacht angezogenen Flüssigkulturen (Vorkultur, 5 ml) auf eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,1 angeimpft und bei 37 °C auf dem Rotationsschüttler bei 200 rpm inkubiert. Alle 30-60 min erfolgte die Messung der optischen Dichte (A<sub>600</sub>) von mindestens zwei Aliquots über einen Zeitraum von bis zu 8 h.

### 5.4 DNS- und RNS-Grundtechniken

#### 5.4.1 Behandlung von Geräten und Lösungen bei Arbeiten mit DNS

Zur Inaktivierung von DNasen und zur Sterilisation wurden hitzestabile Geräte und Lösungen autoklaviert (121 °C, 15 min). Bei hitzelabilen Lösungen erfolgte eine Sterilfiltration (Filter: 24 nm; Roth).

#### 5.4.2 Isolierung von Plasmid-DNS

Die Isolierung von Plasmid-DNS beruht grundsätzlich auf der Methode der alkalischen Lyse (Birboim & Doly, 1979), bei der die unterschiedlichen Denaturierungs- und Renaturierungseigenschaften von chromosomaler und Plasmid-DNS ausgenutzt werden. Bei

dieser Methode werden die Bakterien zunächst mit Hilfe eines NaOH- und SDS-haltigen Puffers (pH 11,0) alkalisch lysiert. Diese chemischen Agenzien denaturieren Proteine, sowie chromosomale und Plasmid-DNS. Das Lysat wird nachfolgend durch einen sauren und stark salzhaltigen Puffer wieder neutralisiert. Die hohe Salzkonzentration bedingt die Präzipitation eines unlöslichen Komplexes bestehend aus SDS, denaturierter chromosomaler DNS und Proteinen, während die ebenfalls denaturierte Plasmid-DNS unter diesen Bedingung re-naturiert. Nach Abzentrifugation des unlöslichen Komplexes befindet sich die zirkulär geschlossene Plasmid-DNS im Überstand.

Je nach Größe, Kopienzahl und benötigtem Reinheitsgrad des zu isolierenden Plasmids wurden unterschiedliche Aufarbeitungen angewandt.

#### **Isolierung nativer Plasmid-DNS nach Kado und Liu, modifiziert (Kado & Liu, 1981)**

Mit dieser modifizierten Aufarbeitung ist es möglich, native Plasmide unkompliziert nachzuweisen.

1,5 ml einer bakteriellen Übernachtskultur wurden abzentrifugiert (6.000 x g, 10 min, Raumtemperatur), der Überstand verworfen und das Pellet in 20 µl Tris/EDTA (50 mM:1 mM) aufgenommen. 100 µl einer Lyselösung (Ansatz von 20 ml: 11,7 ml Aqua bidest., 4 ml 15 %-iges SDS, 4 ml 250 mM Tris, 300 µl 5 M NaOH; nicht lagerfähig) sind hinzugesetzt, kurz eingeswenkt und bei 58 °C 25 min im Wasserbad inkubiert worden. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 µl Phenol/Chloroform (1:1) und die Zentrifugation für 20 min bei 14.000 x g und Raumtemperatur in einer Tischzentrifuge. Die Abnahme des wässrigen Überstandes (~ 70 µl) erfolgte mit abgeschnittenen Spitzen (verhindert das Scheren großer Plasmide) in ein neues Reaktionsgefäß, mit nachfolgender 10 min Kühlung auf Eis. Ein Aliquot wurde mit Bromphenolblaupuffer versetzt, im Agarosegel überprüft und die restliche Plasmid-DNS bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

Da bei dieser modifizierten Aufarbeitung keine Aufreinigung der isolierten Plasmid-DNS erfolgt, kann diese nicht für weitere molekularbiologische Arbeiten eingesetzt werden. Hierzu muss eine vollständige Kado-Lyse durchgeführt werden, bei der die Phenol-/Chloroform-Reste durch nachfolgende Fällungs- und Waschschrte entfernt werden (siehe 5.5.3).

#### **Isolierung von Megaplasmiden nach Nies (Nies et al., 1987)**

Ausgehend von Einzelkolonien wurden Übernachtskulturen angesetzt, die nicht länger als 13 h wachsen sollten. 4 ml der Kultur wurden bei Raumtemperatur pelletiert (6.000 x g, 10 min) und das Pellet in 2 ml Tris-Puffer (75 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,3) resuspendiert. Nach Zugabe von 1 ml Lysis-Puffer (für 40 ml: 5 ml 1 N NaOH und 6 ml 20 %-iges SDS ad 29 ml steriles Aqua bidest.) wurde die Probe für 20 min bei 67 °C im Wasserbad inkubiert. Die Extraktion der Proteine erfolgte nach Zugabe von 400 µl 5 M NaCl und 5 ml Phenol/Chloroform (1:1) mit anschließender Zentrifugation (14.000 x g, 30 min, Raumtemperatur). Die Abnahme der oberen,

wässrigen Phase erfolgte mit abgeschnittenen Pipettenspitzen in ein Polypropylenröhrchen. Zur weiteren Reinigung der DNS wurden 100 µl 1,0 %-ige Essigsäure und 5 ml Diethylether eingeschwemmt. Nach erneuter Zentrifugation (16.000 x g, 3 min, Raumtemperatur) wurde die untere, wässrige Phase mit einer sterilen Pasteurpipette in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 6 ml 96 %-igen Ethanol versetzt und zur DNS-Fällung bei -70 °C (30 min) oder -20 °C (über Nacht) kalt gestellt. Die präzipitierte DNS konnte durch Zentrifugation (16.000 x g, 30 min, 2-4 °C) gesammelt und anschließend mit eiskaltem 70 %-igem Ethanol gewaschen werden. Die Plasmid-DNS wurde nachfolgend ca. 30 min getrocknet und anschließend in 100 µl sterilem Aqua bidest. gelöst. Die Lagerung der DNS erfolgte bei 4 °C im Kühlschrank.

#### **Isolierung von Plasmid-DNS durch verschiedene Präparationskits (Qiagen)**

Die Präparation transformierter Plasmide aus *E. coli* K12-Stämmen erfolgte je nach Kopienzahl und benötigter Menge mit unterschiedlichen Kits von Qiagen. Mit Hilfe des „Plasmid Mini Preparation Kits“ kann etwa 50 µg, mit dem „Midi Kit“ (Qiagentip 100) bis zu 200 µg und dem „Maxi Kit“ (Qiagentip 500) sogar bis zu 1.000 µg hoch aufgereinigte Plasmid-DNS gewonnen werden. Die Reinheit der Plasmid-Isolate wird durch zwischenzeitliches Anbinden der DNS an eine Anionen-Austauscher-Matrix mit nachfolgenden Waschschritten erreicht. Die Isolierung von Cosmid-DNS erfolgte mit Hilfe des Qiagen „Large Construct Kits“ nach demselben Prinzip. Die Isolierungen der Plasmid-/Cosmid-DNS erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers; die Lagerung bei 4 °C im Kühlschrank.

#### **5.4.3 Konzentrationsbestimmung von DNS**

Die DNS-Konzentration wurde fluorometrisch bestimmt. Die spezifische Bindung des Fluoreszenz-Farbstoffs H 33258 in die kleine Furche der doppelsträngigen DNS bewirkt eine Verschiebung des Emissionsspektrums des Farbstoffs von 365 nm nach 458 nm. Der Wert des gemessenen, emittierten Lichtes korreliert mit der DNS-Menge und ist damit ein direkter Indikator für deren Konzentration. Das Gerät wurde vor jeder Nutzung mit einem DNS-Standard (100 ng/µl) und einem Nullwert kalibriert.

#### **5.4.4 Behandlung von Geräten und Lösungen bei Arbeiten mit RNS**

Alle vom Hersteller nicht als RNase- und DNase-frei ausgewiesenen Plastikmaterialien wurden mit 0,1 M NaOH, 1 mM EDTA und 0,1 %-igem DEPC-Wasser (bei 100 °C, 15 min autoklaviert) gespült. DEPC inhibiert Ribonukleasen durch kovalente Modifikation von Histidyl-Gruppen bzw. primären Aminen.

Behandlung von Lösungen: Der Ansatz aller verwendeten Lösungen erfolgte mit 0,1 %-igem DEPC-Wasser.

Behandlung von Glas: Die Materialien wurden entweder bei 240 °C über Nacht sterilisiert oder in

0,1 %-igem DEPC-Wasser für ~12 h bei 37 °C inkubiert und dann für 15 min bei 100 °C autoklaviert.

#### **5.4.5 Isolierung von Gesamt-RNS mittels CsCl-Dichtegradientenzentrifugation**

Diese Aufarbeitungsmethode ermöglicht es, große Mengen reiner RNS zu isolieren. Hierfür werden gramnegative Bakterien durch ein Saccharose-Detergenz-Gemisch lysiert und die RNS mittels organischer Extraktion und Salzpräzipitation von zellulären Komponenten befreit. Um den Abbau der isolierten RNS durch Ribonuklease-Aktivität zu verhindern, wird ein Inhibitor (2',3'-verbundenes Oxovanadium-Ion; VRC) zur Ausbildung eines Vanadyl-Ribonukleosid-Komplexes zugefügt. Der Inhibitor ist ein Analogon des aktivierten 2',3'-zyklischen Phosphats und wird von der Ribonuklease als Zwischenprodukt erkannt. Es folgt eine irreversible Anbindung des Komplexes an das Enzym und damit dessen Inaktivierung.

##### **i. Präparation bakterieller Nukleinsäuren**

Von dem jeweiligen Bakterienstamm wurde zunächst eine Übernachtskultur in LB-Medium bei 37 °C angezogen. Ausgehend von dieser Bakterienkultur erfolgte die Anzucht der Hauptkultur (1:100) in 100 ml des gleichen Mediums bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1. Nach Zentrifugation der Bakterienkultur (6.000 x g, 10 min, 4 °C) wurde das Pellet in 2 ml STET-Lysierungs-Puffer (8 % [w/v] Saccharose, 5 % [v/v] Triton X-100, 50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 7,0) resuspendiert und 100 ml 200 mM VRC zugegeben. Proteinverunreinigungen konnten durch Zugabe von 1 ml gepuffertem Phenol mit nachfolgendem Vortexen (1 min) und Zugabe von 1 ml Chloroform unter erneutem Vortexen (1 min) mit nachfolgender Zentrifugation (10.000 x g, 10 min, 4 °C) entfernt werden. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen, in ein neues Röhrchen überführt und die Nukleinsäure durch Zugabe von jeweils 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung und 2 Volumen eiskaltem 100 %-igem Ethanol aus der Suspension gefällt und anschließend abzentrifugiert (10.000 x g, 10 min, 4 °C). Die pelletierte Nukleinsäure wurde anschließend in 2 ml 10 mM VRC resuspendiert.

##### **ii. Aufreinigung von RNS mittels CsCl-Gradienten-Zentrifugation**

Der präparierten und resuspendierten Nukleinsäure wurden 5 ml Millipore-Wasser und 4,5 g CsCl zugesetzt. Nach Lösen des Salzes wurde das Volumen mit Millipore-Wasser auf 9 ml aufgefüllt und die Probe in 14 x 98 mm SW 40-Ultrazentrifugen-Röhrchen (Beckmann Instrumente Technik GmbH, München) überführt, die zuvor mit 3 ml eines CsCl-Polsters (5,7 M CsCl in 100 mM EDTA, pH 7,0) gefüllt worden waren. Die Zentrifugation der Proben erfolgte anschließend bei 150.000 x g für 36 h (20 °C) in einer Ultrazentrifuge. Nach der Zentrifugation wurden die chromosomale und Plasmid-DNS mit dem CsCl durch eine RNase-freie Pasteurpipette entfernt und das RNS-Pellet anschließend in 360 µl Millipore-Wasser resuspendiert. Durch Zugabe von Natriumacetat (3 M, 1/10 Vol.) und eiskaltem Ethanol (2,5 Vol.) wurde die RNS präzipitiert und

nachfolgend durch Zentrifugation (20.000 x g, 5 min, Raumtemperatur) zurückgewonnen. Nach Trocknung der RNS (30 min, bei Raumtemperatur) wurde diese in 200 µl Millipore-Wasser resuspendiert, aliquotiert (15 µl) und bei -70 °C eingefroren.

#### **5.4.6 Isolierung von RNS mittels "SV Total RNA Isolation System"**

Zur schnelleren Präparation von Gesamt-RNS aus gramnegativen Bakterien wurde alternativ das „SV Total RNA Isolation System“ (Promega) nach Angaben des Herstellers genutzt. Ausgehend von einer frisch angezogenen Bakterienkultur ( $OD_{600}$  1) erfolgt hier die Lyse der Zellen unter Einwirkung von Lysozym (0,4 mg/ml), sowie GTC (Guanidin-Thiocyanat; 4 M) und  $\beta$ -Mercaptoethanol (Endkonzentration: 0,97 %). GTC und  $\beta$ -Mercaptoethanol interagieren mit den nach der Lysis freigesetzten Proteinbestandteilen. Während GTC in Zusammenarbeit mit SDS (Bestandteil eines Puffers) Nukleoprotein-Komplexe zerstört, denaturiert  $\beta$ -Mercaptoethanol Proteine, indem es Disulfan-Bindungen spaltet. Die Klärung des Lysates erfolgt durch Zugabe von Ethanol (95 %-ig) und einer nachfolgenden Abzentrifugation der präzipitierten Proteine und Zelltrümmer. Eine Kontamination der aufgereinigten RNS mit DNS-Moleküle wurde durch einen Verdau mit dem Restriktionsenzym DNase I verhindert und zugesetzte Salze, Proteine und zelluläre Bestandteile durch Waschvorgänge eliminiert. Abschließend erfolgt eine Elution der isolierten RNS mit 100 µl Millipore-Wasser, von der nachfolgend Aliquots (20 µl) zur Lagerung bei -70 °C eingefroren bzw. frisch für die reverse Transkription eingesetzt wurden.

#### **5.4.7 Konzentrationsbestimmung von RNS**

Die Quantifizierung der RNS erfolgte durch Bestimmung der Absorption bei 260 nm ( $A_{260}$ ) und 280 nm ( $A_{280}$ ) im Spektralphotometer. Bei einem  $A_{260}/A_{280}$  Ratiowert von 2,0 lag reine RNS vor. Ratiowerte unter 2,0 zeigten DNS-, Werte über 2,0 Proteinverunreinigungen auf.

### **5.5 Nukleinsäureanalytik**

#### **5.5.1 Restriktion**

Mit Hilfe von Typ II-Restriktionsendonukleasen lässt sich DNS an spezifischen Sequenzen schneiden. Die Restriktion erfolgte in der Regel in 20-40 µl Gesamtvolumen unter den, von der Bezugsfirma angegebenen Bedingungen. Zur Restriktion von 1 µg DNS wurden 5 U Enzym zugesetzt. Bei Doppelverdau mit Restriktionsenzymen, deren optimale Aktivität unterschiedliche Pufferbedingungen benötigten, schloss sich nach der ersten Restriktion ein Aufreinigungsschritt der Nukleinsäure (siehe 5.5.3) an.

### 5.5.2 Makrorestriktion

Bei der Makrorestriktion wird die DNS mit Hilfe eines selten schneidenden Enzyms restringiert. Auf diese Art und Weise wurden DNS-Fragmente eines Gesamtgenoms generiert und anschließend mittels PFGE (siehe 5.5.9) aufgetrennt. Nach Transfer der DNS auf eine Nylon-Membran (siehe 5.8), konnte diese für DNS-DNS-Hybridisierungsversuche genutzt werden (siehe 5.8).

### 5.5.3 Aufreinigung von Nukleinsäuren

#### Fällung von Proteinen

Mit Hilfe der Phenol-Chloroform-Extraktion lassen sich Proteine aus wässrigen Lösungen entfernen. Hierzu wurde der Ansatz mit 1 Vol. eines Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (25/24/1) versetzt und 30 s auf dem Vortexer gemischt. Während der anschließenden Zentrifugation (14.000 x g, 1 min, Raumtemperatur) der Suspension kam es zur Ausbildung einer Interphase, die die obere wässrige von einer unteren organischen Phase trennte. Während die Interphase ausgefallene Proteine beinhaltet, ist die Nukleinsäure Teil der wässrigen Phase. Die Interphase und das organische Gemisch wurden verworfen und die Phenolreste der wässrigen Lösung mit 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24/1) ausgeschüttelt. Zur Rückgewinnung der Nukleinsäure erfolgte eine Ethanol-fällung.

#### Rückgewinnung/Aufkonzentrieren von Nukleinsäuren

Der Nukleinsäure-haltigen Lösung wurden 1/10 Vol. Ammoniumacetat (3 M, pH 5,2) und 2 Vol. (bei RNS 2,5 Vol.) absoluter Ethanol zugesetzt. Danach erfolgte eine Inkubation für mindestens 30 min bei -20 °C. Die Sedimentation der DNS erfolgte durch Zentrifugation des Ansatzes (20.000 x g, 30 min, 4 °C). Das DNS-Pellet wurde nachfolgend mit 70 %-igem, das RNS-Pellet mit 95 %-igem Alkohol gewaschen und erneut zentrifugiert (20.000 x g, 10 min, 4 °C). Nach Lufttrocknung des Pellets wurde die Nukleinsäure in Aqua bidest. oder TE-Puffer resuspendiert.

### 5.5.4 Klonierung von DNS-Fragmenten

Durch kovalente Bindung eines heterologen DNS-Fragmentes in einen Vektor entsteht ein rekombinantes Plasmid. Die erfolgreiche Klonierung des DNS-Fragmentes wird vor allem durch die Kompatibilität der Enden von Fragment und Vektor beeinflusst. Die höchste Klonierungseffizienz ist durch die Verwendung zweier Endonukleasen zu erzielen, die an den Restriktionsstellen nicht-komplementäre (kohäsive) Überhänge erzeugen. Ein auf diese Weise restringiertes DNS-Fragment kann nur in einer Orientierung in den mit den gleichen Restriktionsendonukleasen linearisierten Vektor kloniert werden.

### Dephosphorylierung

Um die intermolekulare Ligationsrate der DNS zu erhöhen, erfolgte ein Dephosphorylierungsschritt vor der Ligation. Dabei wurde die vollständig restringierte DNS in einem bestimmten Volumen (40 µl) mit alkalischer Phosphatase aus Kälbern (1 U/µg DNS) versetzt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte das Abstoppen der Reaktion mit 2/10 Vol. EDTA (200 mM). Durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion mit nachfolgender Ethanol-fällung (siehe 5.5.3) konnte die DNS zurückgewonnen werden.

### Ligation

Bei der Ligation kommt es zu einer kovalenten Verknüpfung der Enden eines heterologen DNS-Fragmentes mit den Enden des linearisierten Vektors. Diese Reaktion wird durch eine DNS-Ligase unter Verbrauch von ATP katalysiert. Dabei wird eine Phosphodiesterbindung zwischen dem 3'-Hydroxy- und dem 5'-Phosphatende der aneinander gelagerten DNS-Enden ausgebildet. Die T4-DNS-Ligase ist in der Lage neben kohäsiven auch nicht-kohäsive DNS-Enden zu verknüpfen. Das mengenmäßige Verhältnis des Ligationsvektors und der Insertionsfragmente pro Ansatz bestand bei kohäsiven Enden 1:2. Die Ligation erfolgte in einem Gesamtvolumen von 10 µl mit 2 µl 5 x Ligase Puffer und 0,5 µl Ligase bei 12 °C über Nacht. In einem der Ligation ähnlichen Verfahren erfolgte die Verknüpfung von DNS-Fragmenten in den pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO-Cloning Vektor (Invitrogen) mit Hilfe der Topoisomerase I. Die Topoisomerase I bindet an die doppelsträngige DNS und spaltet das Phosphodiesterückgrat bei einer spezifischen Nukleotidabfolge. Es entsteht eine vorübergehende Bindung zwischen der DNS und dem Enzym, die durch den Angriff eines 5'-Hydroxylendes von DNS-Fragmenten aufgehoben werden kann und zur Bildung des heterologen Vektors führt (Shuman, 1994).

### 5.5.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei einer PCR wird *in vitro* durch eine hitzestabile Polymerase ein bestimmter DNS-Abschnitt vervielfältigt (amplifiziert). Neben dem Enzym (z. B. Taq-DNS-Polymerase aus *Thermus aquaticus*) und der DNS-Matrize werden zwei gegenläufige, zur DNS homologe Oligonukleotid-Primer benötigt. Eine PCR umfasst typischerweise drei Schritte: Nach der Denaturierung der DNS-Matrize (94-96 °C) erfolgt das Annealing (55-68 °C), bei dem die Oligonukleotid-Primer mit der Matrize hybridisieren. Im nächsten Schritt bindet die DNS-Polymerase an das Oligonukleotid-Matrizenhybrid (72 °C) und synthetisiert komplementäre DNS-Stränge in 5'-3'-Richtung. Durch mehrfache Wiederholung (30-40 Durchläufe) des Temperatur-Zyklus kommt es zu einer exponentiellen Vermehrung des DNS-Fragmentes.

50 µl Reaktionsansätze hatten folgende Zusammensetzung:



Mengen	Komponenten
5,0 µl	Polymerase -Puffer (10 x)
1,5 µl	MgCl <sub>2</sub> (50 mM)
1,0 µl	dNTPs (je 10 mM)
2,5 µl	Sense-Primer (10 pmol)
2,5 µl	Antisense-Primer (10 pmol)
0,5 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)
ad 50 µl	Steriles Aqua bidest.

Die Ansätze wurden im Thermocycler zunächst bei 94 °C für 3 min erhitzt und dann in 25-30 sich wiederholenden Zyklen erneut denaturiert (30 s bei 94 °C), mit nachfolgendem Annealing der Primer (siehe Angaben in Tab. 11) für 30 s und einer Primer-Extension von 1,5 min bei 72 °. Als Template-DNS dienten isolierte Plasmid- und Cosmid-DNS sowie Einzelkolonien von Bakterienstämmen (direkt von der Agarplatte gepickt). Bei jeder PCR wurde eine Negativ- (Aqua bidest.) und eine Positiv-Kontrolle zur Überprüfung der PCR-Bedingungen mitgeführt.

### 5.5.6 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wird mRNA in c(copy)-DNS umgeschrieben. Die cDNS kann zum Nachweis spezifischer Gensequenzen dienen, indem sie als Template in einer PCR eingesetzt wird. Für das Umschreiben der mRNA in cDNS ist eine RNS-abhängige DNS-Polymerase (z. B. aus dem „Meloney murine leukemia virus“, M-MLV RT; Promega) notwendig. Die für gentechnische Arbeiten eingesetzte M-MLV RT weist eine Punktmutation (H-) auf, die für eine fehlende RNaseH-Aktivität verantwortlich ist. Dadurch ist die Möglichkeit gegeben, auch aus langen mRNA-Templates (> 5 kb) eine cDNS zu synthetisieren.

Um die Sekundärstruktur der mRNA aufzulösen, wurde diese in einem entsprechenden Volumen bei 70 °C für 5 min erhitzt, und anschließend sofort auf Eis abgekühlt.

Folgende Komponenten mussten zum Ansatz pipettiert werden

Mengen	Komponenten
5,0 µl	M-MLV RT 5 x Reaktionspuffer
1,25 µl	dNTP-Mix (10 mM)
2,0 µl	Hexamerprimer (Random hexamers, 1 µg)
0,6 µl	RNase-Inhibitor (40 U/ µl)
variabel	RNA (1 µg)
1,0 µl	Reverse Transkriptase (20 U)
ad 25 µl	Steriles Aqua bidest.

Das Umschreiben der mRNA in cDNA erfolgte bei 37 °C für 60 min. Die Deaktivierung der Enzyme fand durch Hitzeeinwirkung (70 °C für 15 min) statt.

### 5.5.7 RACE-PCR “Rapid Amplification of cDNA-5’ ends”

Zum Nachweis der Transkriptions-Startpunkten von *tsh* und *iss* wurde der RACE-Kit von Promega genutzt (Frohman et al., 1988). Ausgehend von einer hohen Konzentration isolierter Gesamt-RNS des Bakteriums wurde unter Verwendung der jeweiligen genspezifischen Primer und der SUPERScript™II-Transkriptase (M-MLV RT) das 5’-Ende der mRNA von *tsh* und *iss* revers transkribiert. Innerhalb des 4132 bp großen *tsh* wurde der Primer so gewählt, dass noch 494 bp des Gens amplifiziert werden konnten (GSP1<sub>tsh</sub>-Position: 494-475 bp). Bei dem 309 bp großen *iss* wurde entsprechend der p1ColV<sub>5155</sub>-Sequenz ein Oligonukleotidprimer stromaufwärts vom Gen ausgewählt [Position (+)91 bp - (+)68 bp], um ebenfalls eine Spezifität zu garantieren. Die copy(c)-DNS liegt zunächst mit der mRNA als Heteroduplexmolekül vor. Die synthetisierte cDNA umfasst neben einem Teil des Gens auch seinen Transkriptionsstartpunkt, von dem ausgehend später die Promotorsequenz bestimmt werden kann.

Ein RNase-Mix baut zunächst die *tsh/iss*-spezifische mRNA aus dem mRNA/cDNA-Heteroduplexmolekül ab und nach erfolgter Desoxynukleotidyltransferase (TdT) vermittelter Anlagerung eines Poly-dC-Schwanzes an das 3’-Ende der jeweiligen cDNA kann eine Amplifikation des Transkriptionsstartpunktes mittels PCR erfolgen. Dieser Poly-dC-Schwanz dient als Adaptor für einen vorwärts gerichteten Primer („Abridged-Anker-Primer“), der Bestandteil des Kits ist. Ein zweiter, stromaufwärts im Gen platzierter spezifischer Oligonukleotid-Primer (GSP2), wurde als reverser Primer eingesetzt (GSP2-Position: 312-293 bp bei *tsh* und 15-141 bp bei *iss*). Das amplifizierte PCR-Produkt diente wiederum als Template für eine weitere nested PCR. Mit einem dritten genspezifisch gelegenen Primer (GSP3, Position 73-54 bp bei *tsh* und 56-39 bp bei *iss*) und dem Universalprimer AUAP (für den Adaptorbereich) konnte der Transkriptionsstartpunkt inklusive der ersten Basen des Gens so stark amplifiziert werden, dass sie im Agarosegel nachweisbar wurden. Die Amplifikation der Transkriptionsstartpunkte von *tsh* und *iss* erfolgte durch die Polymerase „Herkulase“, die als 3’-5’ Exonuklease eine Korrekturaktivität aufweist.

Alle Komponenten der RACE-PCR wurden in dünnwandige 0,2 ml MicroAmp® (Applied Biosystems) Reaktionsgefäße pipettiert und nachfolgend im PCR-Cycler inkubiert. Die 5’-RACE wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

### 5.5.8 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung von PCR-Produkten mittels „High Pure PCR Product Purification Kit“ (Boehringer) dient der Entfernung überschüssiger Polymerase, Oligonukleotid-Primer und

dNTPs. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Das PCR-Produkt wurde mit 30-50 µl sterilem Aqua bidest. eluiert und gegebenenfalls bei -20 °C gelagert.

### **5.5.9 Agarosegel-elektrophoretische Analyse von Nukleinsäuren**

Mit Hilfe der Gelelektrophorese lassen sich DNS-Fragmente entsprechend ihrer Größe auftrennen. Aufgrund ihrer negativen Ladung wandert die DNS im elektrischen Feld zur Anode, wobei ihre Geschwindigkeit umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Fragmentlänge ist. Aus diesem Grund wandern kleinere Fragmente schneller als größere. Mit Hilfe eines parallel aufgetragenen Markers kann die Größe der aufgetrennten DNS-Fragmente abgeschätzt werden.

#### **Standard Agarosegel-Elektrophorese**

Für die gelelektrophoretische Auftrennung der DNS wurde die zu trennende Probe mit 0,3 Vol. einer Farbstoff-Schwerelösung (0,07 % [w/v] Bromphenolblau, 33 % [v/v] Glycerin, 7 % [w/v] SDS) vermischt. Je nach DNS-Fragmentgröße wurden 0,6 bis 1,5 % [w/v] Agarose in 1 x TBE-Puffer aufgekocht und anschließend auf 63 °C temperiert. Pro 100 ml Agarose erfolgte der Zusatz von 5 µl 1 %-igem Ethidiumbromid (10 mg/ml). Nach Gießen des Gels musste dies für mindestens 30 min bei Raumtemperatur aushärten. Pro Geltasche wurden 10-30 µl Probe pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte in TBE-Puffer bei einer Spannung von 5 V/cm bis zu der gewünschten Auftrennung. Nach dem Elektrophoreselauf wurden die DNS-Banden auf einem UV-Transilluminator bei 254 nm visualisiert und mit Hilfe einer CCD-Kamera über einen angeschlossenen Thermodrucker dokumentiert.

#### **Agarosegel-Elektrophorese von nativen Plasmiden**

0,8 % [w/v] Agarose wurden in 1 x TAE-Puffer aufgekocht, auf 63 °C temperiert und ohne den Zusatz von Ethidiumbromid in den Gelträger gegossen. Nach Gießen und Aushärten des Gels wurden pro Geltasche 10-30 µl Probe mit einem entsprechenden Volumen Schwerelösung pipettiert. Zur Abschätzung der Größe der isolierten Plasmide wurden native Referenzplasmide bekannter Größe (z.B. V517, R1, R27, R478) mitgeführt. Die Elektrophorese erfolgte in 1 x TAE-Puffer, wobei die Probe bei 40 V/cm in das Gel hinein und bei 80 V/cm weiter bis zu der gewünschten Auftrennung lief. Zur visuellen Detektion der DNS wurde das Agarosegel im Anschluss an die Elektrophorese für 30 min in ein Bad aus 0,5 µg Ethidiumbromid/ml Aqua bidest. gelegt und zum Entfernen von überschüssigem Ethidiumbromid kurz gewässert.

#### **Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)**

Ausgehend von einer Übernachtskultur wurde eine Bakteriensuspension mit einer OD<sub>600</sub> von 1 hergestellt, 1,5 ml davon abzentrifugiert (6.000 x g, 10 min, 4 °C) und das Pellet in 0,5 ml einer 0,9 %-igen NaCl-Lösung resuspendiert. 0,75 ml einer 1,5 %-igen Pulsfeld-Agarose (Pulsed Field Certified Agarose; BioRad) wurde mit der Bakteriensuspension vermischt und in Blöckchen

gegossen. Die Hitze der aufgekochten Agarose bedingt ein Lysieren der Bakterien. Um freierwerdende Proteine/Enzyme zu deaktivieren, wurden die Blöckchen für mindestens 24 h bei 56 °C mit Proteinase K (23,4 mg Proteinase K/13 ml ESP-Lösung: 500 mM EDTA, 1 % Sarcosyl, pH 9,5) inkubiert. Um die Proteinase K wieder zu entfernen wurden die Blöckchen 3 x für jeweils 1,5 h in 14 ml TE-Puffer (1 x TE-Puffer für PFGE: 10 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 7,5 mit HCl einstellen, ad 1 l Aqua bidest.) bei 4 °C gewaschen. Ein Drittel eines Blöckchens wurde mit einem dem Enzym entsprechenden Puffer (0,6 ml) 30 min äquilibriert, während der Restblock in TE-Puffer bei 4 °C für einen Monat haltbar war. Nach Entfernen des Äquilationspuffers wurde das zu untersuchende Blöckchen über Nacht in 150 µl des Enzympuffers mit 20 Units/ml Enzym bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte der Austausch des Enzyms gegen TE-Puffer, in dem die Blöckchen bis zur Nutzung bei 4 °C aufbewahrt wurden. Es erfolgte die Herstellung 1 %-iger Agarose (Pulsed Field Certified Agarose; BioRad) durch Aufkochen in 0,5 x TBE. Nachdem diese auf 50 °C im Wasserbad abgekühlt war, wurden 98 ml auf einen vorbereiteten Geltisch gegossen. Das Aushärten des Gels erfolgte für mindestens 30 min bei Raumtemperatur. Das vom Enzym und Puffer befreite Blöckchen wurde in einen Slot überführt und mit etwas flüssiger Agarose überschichtet. Die Auftrennung der restringierten DNS erfolgte in 2,2 l Laufpuffer (0,5 x TBE, 14 °C) für 22 h bei 14 °C (Winkel: 120°, Spannung: 6 V, Puls: 5-50). Zur Dokumentation mußte das Gel nach dem Lauf für 30 min im Ethidiumbromidbad (0,5 µg/ml Aqua bidest.) gefärbt und kurz in Aqua bidest. gespült werden.

#### **5.5.10 Elution von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen**

DNS-Fragmente wurden aus Agarosegelen durch den "Agarose Gel DNS Extraction Kit" (Roche) eluiert. Das Prinzip dieser Aufarbeitungsmethode ist, das elektrophoretisch aufgetrennte DNS aus dem Gel herausgeschnitten und in Gegenwart hoher Konzentrationen einer chaotropen Salzlösung (z.B. Na-Perchlorat) unspezifisch an eine Silicamatrix bindet. Nach Entfernen des Salzes durch entsprechende Waschschrte mit einem ethanolhaltigen Puffer wird die DNS mit Aqua bidest. oder TE-Puffer von der Matrix gelöst. Die Elution der DNS-Fragmente erfolgte nach Anleitung des Herstellers.

#### **5.5.11 Sequenzanalyse von Plasmiden und Cosmiden**

Die DNS-Sequenzanalyse wurde nach der Methode der Didesoxy-Kettenabbruchreaktion nach Sanger (Sanger & Coulson, 1975) von der Firma LGC Genomics GmbH durchgeführt. Bedingt durch den Einsatz von Didesoxynukleotiden wird die DNS-Synthese basenspezifisch terminiert, wodurch unterschiedlich lange Fragmente generiert werden. Ein Didesoxynukleotid (ddNTP) führt zum Abbruch der Strangsynthese, da ddNTPs keine freie 3'-Hydroxylgruppe besitzen, die für die Bildung der nachfolgenden Phosphodiesterbindung erforderlich ist. Es werden für diese

Reaktion sowohl Didesoxy- als auch Desoxynukleotide angeboten, so dass statistisch der Kettenabbruch an jedem Nukleotid erfolgen kann. Jedes der vier ddNTPs ist mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt durch den die Base, an der der Abbruch erfolgte, identifizierbar wird. Die Sequenzierung erfolgte durch spezifisches Primerwalking oder unter Verwendung von Universalprimern (TOPO-Vektor; Invitrogen).

## 5.6 Konjugation von Plasmiden

Für die Erzeugung von Transkonjuganten wurde die IMT5155-Mutante M00D01 als Plasmid-spendender Donorstamm und der *lacZ*-negative *E. coli* K12-Stamm KT2442 (MG1655 $\Delta$ *lacIZrph*<sup>+</sup>) als Akzeptor eingesetzt. Durch die Verwendung der Mutante von IMT5155 kann eine Transkonjugante des KT2442-Stammes mit dem pColV-Plasmids (p1D01, *traG*::Tn5*km2*) von M00D01 auf Kanamycin-supplementierten McConkey-Agar selektionierbar gemacht werden.

### Konjugation in Flüssigmedium

Der Konjugationsversuch erfolgte in LB-Bouillon, indem bei einer OD<sub>600</sub> von 1 0,5 ml des Donors zu 4,5 ml Rezipientenkultur gegeben wurde. Die Inkubation der Suspension erfolgte bei 37 °C im Wasserbad für 20 h. Anschließend wurden jeweils 50 µl auf entsprechend supplementierten MacConkey Agarplatten ausplattiert, auf denen die *lac*-negativen Transkonjuganten als hellrote Kolonien nachweisbar sein sollten.

### Konjugation auf festen Medien

Häufig ist die fehlende Stabilität des ausgebildeten Pilus für ein Fehlschlagen der Konjugation verantwortlich. Zur besseren Fixierung des Pilus kann der Plasmidtransfer auf LB-Platten mit einer Filterunterlage (GS Milipore; 0,22 µm) wiederholt werden. 0,5 ml der Donor- und Akzeptorsuspension wurde hierzu pelletiert, in 0,01 M MgSO<sub>4</sub> (10 µl) resuspendiert und auf den Filter pipettiert. Nach einer Inkubation von 3 bzw. 24 h bei 37 °C wurde der Filter mit 3 ml 0,01 M MgSO<sub>4</sub> Lösung abgespült und auf insgesamt 200 entsprechend supplementierte MacConkey-Platten ausplattiert.

## 5.7 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNS

### Gewinnung kompetenter Bakterienzellen

Für die Transformation von *E. coli*-Stämmen mit Plasmid-DNS war es notwendig, die Zellen in einen für die Transformation kompetenten Zustand zu bringen, da *E. coli* im Gegensatz zu einigen anderen Stämmen (z.B. *Bacillus subtilis*) nicht natürlich transformierbar ist. Für die Gewinnung kompetenter Bakterienzellen zur Elektroporation von Plasmid-DNS < 100 kb wurde eine Übernachtskultur (LB-Medium, 37 °C) des entsprechenden *E. coli*-Stammes 1:50 in 200 ml LB-Medium verdünnt und bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 inkubiert. Für die Elektroporation von

Plasmiden > 100 kb wurde SOB-Medium zur Anzucht der Vor- und Hauptkultur verwendet. Nach Erreichen der Zelldichte von OD<sub>600</sub> 0,6 erfolgte eine Zentrifugation (936 x g, 5 min, 4 °C) in 50 ml Reaktionsgefäßen. Die pelletierten Bakterien wurden in 25 ml eiskaltem Waschpuffer resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und nach zwei weiteren Waschschritten erfolgte die Aufnahme des Bakterienpellets in 400 µl Waschpuffer (10 % (v/v) Glycerol in Aqua bidest.; autoklavieren). Aliquots der Zellen wurden in entsprechende Reaktionsgefäße abgefüllt, schockgefroren und bei -70°C gelagert oder direkt verwendet.

#### **Elektroporation kompetenter Bakterienzellen mit Plasmid-DNS < 100 kb**

Bei der Elektroporation wurde in diesem Fall eine Suspension aus elektrokompenten Bakerienzellen und Plasmid-DNS kurzfristig starken Strompulsen ausgesetzt. Die Strompulse sind so gewählt, dass die bakteriellen Membranen vorübergehend für große Moleküle durchlässig und die positiv geladene Plasmid-DNS durch den gerichteten Stromfluss in die Bakterienzellen transferiert wird. Zur Transformation wurden 10-100 ng Plasmid-DNS zu 40 µl 4 °C kalten kompetenten Zellen gegeben, 1 min auf Eis inkubiert und luftblasenfrei in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (0,2 mm Schichtdicke; EQUIBIO peQLab Biotechnologie GmbH) überführt. Die Elektroporation erfolgt bei 2,5 kV/cm, 25 µF, 200 Ω und einer Pulslänge von 4,5 ms in dem Elektroporator EasyjectT Plus. Nach Zugabe von 1 ml SOC-Medium wurde die Bakteriensuspension in ein steriles Reaktionsgefäß überführt und zur Regeneration und Expression der plasmidcodierten Resistenz im Thermomixer inkubiert. Dauer und Temperatur der Inkubation waren abhängig von dem transferierten Plasmid. Danach erfolgte die Plattierung von 100-200 µl der Zellsuspension auf geeigneten Selektionsplatten mit nachfolgender Inkubation bei entsprechender Temperatur für 1-2 Tage im Brutschrank.

#### **Elektroporation kompetenter Bakterienzellen mit Plasmid-DNS > 100 kb**

Die Effizienz der Transformation von *E. coli*-Stämmen mit hochmolekularer Plasmid-DNS hängt wesentlich von dem gewählten Akzeptor-Stamm, dem Volt-Gradienten und der Elektroporationszeit ab. Als Akzeptoren eignen sich nur Stämme, die aufgrund spezifischer Mutationen keine intrazellulären Endonukleasen aufweisen und daher besonders große Mengen fremder DNS aufnehmen können (z.B. DH10B, DH5 und DH5α). Für die Elektroporation wurden 30 µl elektrokompente Zellen in ein Reaktionsgefäß auf Eis mit 2 µl Plasmid-DNS vermischt. Die Suspension wurde ebenfalls luftblasenfrei in eine vorgekühlte Küvette (0,1 mm; BioRad) überführt. Die anschließende Elektroporation erfolgte bei 1,8 kV/cm, 25 µF, 100 Ω über eine Zeit von 2,47 s. Danach wurden 0,5 ml SOC in die Küvette gegeben und die Bakteriensuspension in ein steriles Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Inkubation von 45 min bei 37 °C wurden 25 µl und 250 µl Zellen auf LB-Platten mit Antiinfektiva (Kanamycin) ausplattiert und für mindestens 24 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

## 5.8 DNS-DNS-Hybridisierung

### Sondenherstellung mittels PCR

Die Markierung von DNS-Sonden erfolgte mit Hilfe des „Dig DNS Labeling Kit“ (Boehringer) durch die Amplifikation der spezifischen Gensequenz. Etwa 100 ng DNS wurden für eine PCR (50 µl-Volumen) eingesetzt, bei der entsprechend der Größe des zu amplifizierenden Fragmentes 2-5 µl markierte dNTPs und genspezifische Oligonukleotid-Primer hinzupipettiert wurden. Bei der Neusynthese der DNS erfolgt der Einbau des im dNTP-Gemisch enthaltenen, dUTP-gekoppelten Digoxigenins (Dig). Das Dig-markierte DNS-Fragment wurde anschließend in einem präparativen Agarosegel auf die richtige Größe überprüft, ausgeschnitten und mit dem „Agarose Gel Purifikation Kit“ (siehe 5.5.10) nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt.

### Sondenherstellung mittels Random-Primer

Mit Hilfe des „Dig DNS Labeling Kit“ (Boehringer) ließen sich auch die Fragmente restringierter Cosmide und Plasmide markieren. Etwa 500 ng DNS wurden in einem Volumen von 14 µl Aqua bidest. aufgenommen, denaturiert (5 min kochen im Wasserbad) und sofort wieder im Eisbad heruntergekühlt. Anschließend wurden 2 µl Hexanukleotid-Primer und 2 µl eines markierten dNTP-Gemisches hinzupipettiert. Nach Auffüllen des Ansatzes auf 18 µl mit Aqua bidest., erfolgte die Zugabe von 2 µl Klenow-Polymerase und eine Inkubation über Nacht bei 37 °C. Während der Inkubation werden die Hexanukleotide als Random-Primer genutzt, die nach der Denaturierung der Template-DNS zufällig an die Einzelstränge binden. Die Gegenstrangsynthese erfolgte durch das Klenow-Fragment der DNS-Polymerase I, die aus dem bereitgestellten Nukleotidmix neben unmarkierten auch Dig-markierte Nukleotide einbaut. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

### Transfer von DNS-Fragmenten auf Membranen (Southern Blot)

Um Nukleinsäure-Fragmente für DNS-DNS-Hybridisierungen verwenden zu können, müssen diese denaturiert auf eine Trägermembran gebracht werden. Dies geschieht mit Hilfe eines Alkali-Blots, bei dem die Fragmente durch Kapillarkräfte auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert und anschließend fixiert werden. Für den DNS-Transfer wurden 500-1.000 ng restringierte DNS in einem präparativen Agarosegel aufgetrennt und anschließend depurinert (0,25 M HCl, 10 min bei Raumtemperatur). Die Depurinierung bewirkt eine Fragmentierung großer DNS-Fragmente und damit deren erleichterten Transfer aus der Agarose auf die Membran. Nach der Depurinierung erfolgten einige Denaturierungsschritte (in 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) und ein Neutralisierungsschritt (in 0,5 M Tris-HCl, pH 7,5; 1,5 M NaCl) der zu überführenden DNS. Der für die Neutralisierung genutzte Puffer konnte auch als Transferpuffer genutzt werden. Für den DNS-Transfer auf eine positiv geladene Nylonmembran (Boehringer) wurde das

Agarosegel auf einen mit saugfähigem Papier (Whatman 1MM) umschlagenen Geltisch gelegt, mit einer positiv geladenen Nylonmembran sowie vier Lagen Whatmanpapier (3MM) belegt. Auf diese „Sandwich“-Anordnung wurde ein Stapel saugfähiges Papier platziert, das Ganze beschwert und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Durch den Kapillarstrom bewegt sich der Transferpuffer durch das Gel über die Nylonmembran in das saugfähige Papier und ermöglicht damit eine kovalente Bindung der fragmentierten DNS an die positiv geladene Membran. Nach dem Transfer erfolgte zur Stabilisierung der DNS das Schwenken der Membran in 2 x SSC-Puffer (0,3 M NaCl, 0,03 M Na-Citrat). Durch eine anschließende Hitzeeinwirkung von 120 °C für 20 min wurde die DNS auf der Membran fixiert (backen).

### **Dot-Blot**

Gesamt-DNS wurde auch ohne Restriktion und elektrophoretischer Auftrennung auf Membranen getropft und mittels backen immobilisiert („Dot Blot“). Hierzu wurden 100 µl einer Übernachtskultur in 100 µl Aqua bidest. suspendiert, für 10 min durch Kochen im Wasserbad denaturiert, schnell auf Eis heruntergekühlt, ein Aliquot auf eine positiv geladene Nylonmembran (Boehringer) getropft und durch backen bei 120 °C für 20 min auf dieser fixiert.

### **Prä-/Hybridisierung der Membran**

Nach erfolgtem DNS-Transfer wurde die Membran mit 2 x SSC Puffer befeuchtet und anschließend in einer spezifischen Lösung (5 x SSC, 1 % [w/v] Blocking Reagent Stock Solution, 0,1 % N-Laurylsarcosin, 0,2 % [w/v] SDS, 20 ml pro 100 cm<sup>2</sup>) bis zu 3 Stunden bei 68 °C prä-hybridisiert. Die doppelsträngige DNS-Sonde wurde durch Kochen (10 min) im Wasserbad denaturiert, im Eisbad für 5 min abgekühlt und in Prähybridisierungslösung auf die Membran gegeben. Die Hybridisierung erfolgte i. d. R. bei 68 °C über Nacht. Anschließend wurde die Membran jeweils zweimal für 5 min mit Stringenz 1 (2 x SSC, 0,1 % SDS) bei Raumtemperatur und für 15 min mit Stringenz 2 (0,1 x SSC, 0,1 % SDS) bei 68 °C gewaschen.

### **Waschvorgang und Hybridisierungsnachweis**

Der Nachweis der DNS-DNS-Hybridisierung erfolgte nach den Angaben des Herstellers mit Lösungen, die denen des „DIG DNS Detection Kit“ (Boehringer) entsprachen. Demnach wurde die Membran nach einem Waschschrift mit Puffer I (100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7,5, 0,3 % [w/v] Tween 20) zunächst 30 min in Blockpuffer (Blocking Reagent Stock Solution im Verhältnis 1:10 in Puffer I ohne Tween) zur Absättigung geschwenkt, nachfolgend in Detektionspuffer (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 9,5) gewaschen und anschließend durch Anti-Digoxigenin, IgG mit gekoppelter alkalischer Phosphatase, in einer Verdünnung von 1:10.000 inkubiert. Digoxigenin-haltige Fragmente konnten infolge der enzymabhängigen Dephosphorylierung von CSPD<sup>®</sup> detektiert werden. Das durch die Phosphatase-Einwirkung



dephosphorylierte Substrat geht in ein instabiles Zwischenprodukt über, dessen Zerfall eine Lichterscheinung mit der Wellenlänge von 477 nm zur Folge hat. Durch Auflegen von Röntgenfilmen (X-OMAT<sup>TM</sup>AR; Kodak) mit unterschiedlich langer Exposition in einer Kassette (1 min über Nacht bei Raumtemperatur) ließ sich das Lichtsignal nachweisen, nachdem der Film 3 min entwickelt, 1 min gewässert und 2 min fixiert wurde.

## 5.9 Expressionsversuche

### 5.9.1 Identifikation von Promotoren

Dem Transkriptionsstartpunkt von Genen folgt der „5′-nicht-Codierungsbereich“, auch als „5′-Leader-Sequenz“ bezeichnet, der zur Transkriptionseinheit des Gens gehört, aber keine Proteincodierenden Funktionen besitzt. Die Länge solcher „5′-nicht-Codierungsbereiche“ ist unterschiedlich und kann mehrere 1.000 bp umfassen. Stromaufwärts des nicht-codierenden Bereichs befinden sich die (-)35- und die (-)10-Region. Beide Regionen sind Grundelemente des Promotors, die zusammen mit Transkriptionsfaktoren die Effizienz der Gentranskription beeinflussen. Etwa 35 Nukleotide stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt liegt die als (-)35-Region bezeichnete Erkennungsdomäne der Polymerase, die im Idealfall mit der Konsensussequenz 5′-TTGACA-3′ übereinstimmt. Die etwa 10 bp vom Transkriptionsstartpunkt aus stromaufwärts gelegene Sequenz der (-)10-Region wird als Pribnow- oder TATA-Box bezeichnet. Die Konsensussequenz dieser als „Entwindungsdomäne“ bezeichneten Region lautet 5′-TATAAT-3′. Die (-)10- und die (-)35-Region trennen 17-18 bp, die vermutlich in etwa eine der Geometrie der Polymerase angemessene Distanz darstellt. Der Abstand zwischen der (-)10-Region und dem Transkriptionsstartpunkt (+1) beträgt 5-7 bp. Die DNS-abhängige Polymerase bindet im Bereich der Erkennungssequenz des Promotors und beginnt in der (-)10-Region die DNS zu entwinden. Nach der Transkription spielt dieser Bereich auf der mRNA bei der Einleitung der Translation eine wichtige Rolle. Genspezifische Promotorbereiche wurden bei der sequenzanalysierter DNS mit Hilfe eines Promotor-Suchprogramms bestimmt.

### 5.9.2 Bestimmung der Promotoraktivitäten

Zur Untersuchung der transkriptionellen Aktivität eines Promotors wurde der identifizierte DNS-Abschnitt in den  $\beta$ -Galaktosidase-Expressionsvektor pRS551 ligiert. Dieser besitzt neben Resistenzen gegen Antiinfektiva ( $\text{Amp}^R$  und  $\text{Kan}^R$ ) auch ein promotorloses Gen der  $\beta$ -Galaktosidase, das als Reportergen in Aktivitätsassays genutzt wurde.

## Überprüfung der Promotoraktivität

Inwiefern der ligierte Promotor die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase ermöglichte wurde auf MacConkey-Agar überprüft. Dieser Agar enthält als verwertbare Kohlenstoffquelle den Zucker Laktose. Wird das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase exprimiert, dann spaltet es das Disaccharid Laktose in Glukose und Galaktose, wovon die Glukose durch die Bakterienkolonie fermentativ abgebaut wird. Die Fermentierung von Zuckern hat eine erhöhte Ausscheidung von verschiedenen Säuren und damit ein Absinken des pH-Wertes unterhalb der Bakterienkolonie zur Folge. Der niedrige pH-Wert lässt den zugesetzten Indikatorfarbstoff zu einer purpurroten Farbe umschlagen, weshalb die *lac*<sup>+</sup>-Kolonien rot erscheinen.

### $\beta$ -Galaktosidase-Assay (Hernandez & Bremer, 1993)

Übernachtskulturen des zu testenden rekombinanten Bakterienstammes wurden 1:50 verdünnt, in einer Vorkultur bis zur OD<sub>600</sub> 1 angezogen und dann 1:100 in eine Hauptkultur überführt. Die Anzuchtbedingungen (Medium, Temperatur, Supplemente) der Vor- und Hauptkulturen waren abhängig von der jeweiligen Fragestellung des Versuchs. Stündlich wurde 1 ml von der Hauptkultur entnommen und in zweifach konzentriertem Z-Puffer desselben Volumens überführt (2 x Z-Puffer: 120 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 80 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 20 mM KCl; 100 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol). Durch Zugabe von 25  $\mu$ l 0,1 %-igem SDS und 50  $\mu$ l Chloroform erfolgte eine Permeabilisierung der Bakterienzellen bei 4 °C über Nacht im Kühlschrank. Je nach Aktivität des Promotors wurden 100  $\mu$ l oder 500  $\mu$ l dieser permeabilisierten Zellen mit 1 x Z-Puffer auf ein Endvolumen von 2 ml gebracht und bei 30 °C für 30 min angewärmt. Die vorgewärmte Probe wurde mit 0,4 ml o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid (ONPG; Sigma, München) versetzt und bis zu einer Gelbfärbung der Probe bei 30 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch 1 ml 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> abgestoppt, die Verfärbung im Spektralphotometer (OD<sub>410</sub>) gemessen und anschließend die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität nach einer Formel von Miller in Units berechnet (Murphy, 1998).

Units =  $[\text{OD}_{420} - (1,75 \times \text{OD}_{550})] / \text{Reaktionszeit} \times \text{eingesetztes Kulturvol.} \times \text{OD}_{600} \times 1000$ .

## 5.10 Expressions- und Aktivitätsnachweis verschiedener plasmidcodierter Proteine

### 5.10.1 Colicin-Assay

Um die Colicin V-Produktion von *E. coli*-Stämmen überprüfen zu können, wurden Aliquots von Übernachtskulturen in neues Medium re-inokuliert und bis zu einer OD mit etwa 10<sup>8</sup> Zellen/ml inkubiert. Serielle Verdünnungsstufen der Bakterienkulturen wurden auf LB-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Das Abtöten der Bakterienkolonien erfolgte durch Auflage von chloroformgetränktem Filterpapier für 30 min. Anschließend wurden 10 ml Weichagar-Röhrchen (LB-Flüssigmedium mit 0,8 % Agar) verflüssigt, jeweils mit 1 ml des Colicin V-sensiblen *E. coli*-Stammes (ATCC 23559; 10<sup>8</sup> Zellen/ml) versehen und nachfolgend im Sandwichverfahren auf die

Platten mit den abgetöteten *E. coli*-Kolonien des zu testenden Stammes ausgebracht. Nach erneuter Inkubation der Platten bei 37 °C über Nacht wurde die Produktion von Colicin V durch Plaques im Bakterienrasen sichtbar, die infolge der Abtötung des Colicin V-sensiblen *E. coli*-Stammes entstanden waren.

### 5.10.2 Siderophoren-Assay

#### Siderophoren-Nachweis auf CAS-Agar

Für diesen Nachweis wurden die verschiedenen *E. coli*-Stämme über Nacht in LB-Flüssigmedium bei 37 °C angezogen und am nächsten Tag 1:100 in frisches Medium re-inokuliert. Bei einer optischen Dichte von 0,2 (OD<sub>600</sub>) erfolgt die Zugabe des Eisenchelators DIP (100 µM) und eine weitere Inkubation der Kulturen bis zur stationären Phase. 100 µl der jeweiligen Bakterienkultur wurden pelletiert, zwei Mal mit 1 x PBS-Lösung gewaschen, anschließend in 50 µl 1 x PBS-Lösung resuspendiert und auf CAS-Platten ausgestrichen. Gelbe Zonen um die Bakterienkolonien, zeigten eine Siderophoren-Produktion an.

#### Siderophoren-Nachweis in CAS-Flüssigmedium

Die *E. coli*-Stämme wurden hierzu über Nacht in Minimal-Medium M9 mit reduziertem Phosphat bei 37 °C inkubiert und anschließend 1:100 in neues Medium mit verschiedenen Zusätzen (65 µM bzw. 100 µM DIP, 40 µM FeCl<sub>3</sub>) re-inokuliert. Im Abstand von 2 h wurden Aliquots aus der Kultur entnommen, von denen die optische Dichte ermittelt und der Überstand nach Zentrifugation (3.000 x g, 5 min) bei -20 °C eingefroren wurde, bis alle Zeitpunkte beprobt waren. Gleiche Volumenverhältnisse Kulturüberstand und frisch angesetzte CAS-Indikatorlösung wurden in Platten mit 96 Vertiefungen bei Raumtemperatur 60 min unter Schütteln inkubiert. Als Negativ-Kontrolle wurde M9-Medium ohne Bakterienwachstum mitgeführt. Die Siderophoren-Produktion wurde im Spektralphotometer bei A<sub>620</sub> gemessen und für die grafische Darstellung folgendermaßen verrechnet:

$A_{620} \text{ (CAS-Indikatorlösung und M9-Medium ohne Bakterienwachstum)} - A_{620} \text{ (CAS-Indikatorlösung und Kulturüberstand)}$ .

## 5.11 Zellkultur-Versuche

### 5.11.1 Adhäsions-Assays

Adhäsions-Assays wurden mit Makrophagen von Mäusen (J774), aviären Fibroblasten (CEC-32) sowie verschiedenen Bakterienstämmen durchgeführt. Hierzu wurden die eukaryotischen Zellen in dreifacher Wiederholung über Nacht in Platten mit 96 Vertiefungen mit Iscoves (Biochrom) bzw. DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium; Biochrom) Medium und 10 % FKS bis zu einer Dichte von  $3,0 \times 10^4$  bzw.  $1,4 \times 10^5$  Zellen/Vertiefung angezogen. Vor der Infektion wurden die Zellen mit 1 x PBS gewaschen und dann mit neuem Medium (100 µl/Vertiefung) versehen.

Die Bakterienstämme wurden über Nacht mit entsprechenden Zusätzen von Antiinfektiva inkubiert, am nächsten Tag 1:100 in ein entsprechendes Medium re-inokuliert, bei einer OD<sub>600</sub> von ~ 0,6 pelletiert, anschließend in 1 x PBS-Lösung resuspendiert und mit einer Infektionsdosis von MOI 10 auf die Zellen gegeben. Zur Synchronisation der Infektion erfolgte eine kurze Zentrifugation der Platten (5.000 x g, 2 min, Raumtemperatur) und nachfolgend die Inkubation bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit. Eine Stunde nach Infektion wurde der Überstand entfernt, die Zellen 1- bzw. 3-mal mit 150 µl PBS gewaschen und anschließend mit 40 µl 1 %-igem Triton X 100 5 min bei Raumtemperatur lysiert. Die lysierten Zellen wurden auf 200 µl mit PBS aufgefüllt und serielle Verdünnungen auf LB-Platten mit entsprechenden Antiinfektiva ausplattiert und bei 37 °C inkubiert. Die Anzahl adhärenter Bakterien wurde aus der Anzahl Kolonie bildender Einheiten errechnet.

### **5.11.2 Invasions-Assays**

#### **Aviäre Fibroblasten**

Die Infektion der aviäre Fibroblasten (CEC-32) erfolgte nach den Vorgaben des Adhäsions-Assays. Eine Stunde nach Zugabe der Bakterien wurde das Medium entfernt, die Zellen 3 x mit 1 x PBS gewaschen und für drei weitere Stunden zur Abtötung der nicht invasiven Bakterien in DMEM Medium (Biochrom) mit 10 % FKS und 50 µg/ml Gentamycin inkubiert. Das Medium wurde erneut entfernt, die Zellen mit PBS-Lösung gewaschen und Zelltriplikate pro eingesetzten Bakterienstamm mit 40 µl 1 %-iger Triton X 100 (Lösung angesetzt in 1 x PBS) für 5 min bei Raumtemperatur lysiert, auf 200 µl mit 1 x PBS aufgefüllt und serielle Verdünnungen auf LB-Agar mit Antiinfektiva ausplattiert.

#### **Makrophagen**

Die Infektion der Makrophagen (J774) erfolgte nach den Vorgaben des Adhäsions-Assays. Um das intrazelluläre Wachstum der Bakterien in den Makrophagen beurteilen zu können, wurden vier Ansätze pipettiert, denen 30 min bzw. 1 h nach Zugabe der Bakterien das Medium entfernt wurde. Nachdem die Zellen gewaschen waren, erfolgte zunächst eine Inkubation für 30 min in Iscoves-Medium (Biochrom) mit 50 µg/ml Gentamycin und dann für weitere 4 h in Medium mit 10 µg/ml Gentamycin. Das Medium wurde erneut entfernt, die Zellen gewaschen und mit Formaldehyd (4 % v/v) fixiert bzw. für weitere 4 h und 24 h in Medium mit 10 % FKS bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert.

### **5.11.3 Färbungen der Zellkulturen**

#### **Nachweis der bakteriellen Infektion mittels Giemsa-Färbung**

Die mikroskopische Auswertung des Assays erfolgte entweder nach Färbung der Zellen mit Giemsa oder nach Anwendung der Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung(FISH)-Technik. Bei der

Giemsa-Färbung wurden 14 Tropfen Giemsa-Blau in 10 ml Aqua bidest. gegeben und jeweils 1 ml der Lösung zur Färbung der Zellen für 10 min bei Raumtemperatur auf die Deckgläschen gegeben.

#### **Nachweis der bakteriellen Infektion mittels Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung (FISH)**

Bei der FISH-Technik wurde zum Nachweis der Bakterien eine universelle Sonde (EUB338) gegen die 16SrDNS von *E. coli* verwendet, die am 5'-Ende mit dem Fluochrom Fluorescein-isothiocyanat (FITC) gelabelt ist (Thermo Fischer Scientific GmbH). Zum Nachweis der eukaryontischen 18SrDNS Zellen wurde die mit dem Fluochrom Indocarbocyanine (Cy3) markierte Sonde EUK516 genutzt (Interactiva). Jeweils 50 ng Sonde wurden in 10 µl Hybridisierungspuffer (20 % deionisiertes Formamid, 0,45 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.4, mit 0,01 % SDS) eingesetzt und für 4 h bei 46 °C mit den Zellen inkubiert. Nach der Hybridisierung wurden die Deckgläser dreimal mit 1 x PBS gewaschen und zur Darstellung des eukaryotischen Zellskeletts anschließend bei Raumtemperatur für 5 min mit dem DNS-Farbstoff TOP-PRO-3 (Invitrogen) in einer Verdünnung von 1:1.000 inkubiert. Nach einem Wasch- und Trocknungsschritt erfolgte die Einbettung der gefärbten Deckgläser mit ProLong® Antifade Reagent (Invitrogen) und die nachfolgende Analyse mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie.

#### **5.12 *In vivo*-Assays**

*In vivo*-Assays erfolgten mit Hühnern der Rasse White Leghorn (fünf Wochen alt, SPF-Tiere) von Lohmann Tierzucht GmbH nach einem am Institut etablierten Hühnerinfektionsmodell (Antão et al., 2008). Hierfür wurden die eingesetzten Bakterienstämme zunächst auf Agarplatten im Dreistrichverfahren ausgebracht und Einzelkolonien in LB-Flüssigmedium über Nacht bei 37 °C angezogen. Ausgehend von den Übernachtskulturen wurden am Tag der *in vivo*-Assays die jeweiligen bakteriellen Flüssigkulturen re-inokuliert und etwa bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1 (~10<sup>8</sup> bzw. 10<sup>9</sup> Bakterien/ml) bei 37 °C und 200 rpm angezogen. Nach Pelletierung der Zellen wurden diese in PBS so aufkonzentriert, dass 0,5 ml der Suspension jeweils 1,0 x 10<sup>9</sup> Bakterien aufwiesen und den Tieren mittels Knopfkanüle intratracheal appliziert werden konnten. Die Tiere wurden 24 h bzw. 48 h nach der Infektion getötet und Teile von Lunge, Milz, Leber und Niere aseptisch entnommen. Die Organe wurden nachfolgend auf das Vorhandensein von Bakterien untersucht, indem sie zunächst im Verhältnis 1:10 mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung eingewogen, mit einem Ultra-Turrax homogenisiert und anschließend serielle Verdünnungsstufen auf LB-Platten (z.T. mit Antiinfektiva) ausplattiert wurden.

## 6 Literaturverzeichnis

- Achtman, M., Manning, P.A., Kusecek, B., Schwuchow, S. & Willetts, N. (1980) A genetic analysis of F sex factor cistrons needed for surface exclusion in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **138**: 779-795.
- Achtman, M., Mercer, A., Kusecek, B., Pohl, A., Heuzenroeder, M., Aaronson, W., et al (1983) Six widespread bacterial clones among *Escherichia coli* K1 isolates. *Infect. Immun.* **39**: 315-335.
- Achtman, M., Heuzenroeder, M., Kusecek, B., Ochman, H., Caugant, D., Selander, R.K., et al (1986) Clonal analysis of *Escherichia coli* O2:K1 isolated from diseased humans and animals. *Infect. Immun.* **51**: 268-276.
- Adiri, R.S., Gophna, U. & Ron, E.Z. (2003) Multilocus sequence typing (MLST) of *Escherichia coli* O78 strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **222**: 199-203.
- Aguero, M.E., de la Fuente, G., Vivaldi, E. & Cabello, F. (1989) ColV increases the virulence of *Escherichia coli* K1 strains in animal models of neonatal meningitis and urinary infection. *Med. Microbiol. Immunol.* **178**: 211-216.
- Akopyants, N.S., Fradkov, A., Diatchenko, L., Hill, J.E., Siebert, P.D., Lukyanov, S.A., et al (1998) PCR-based subtractive hybridization and differences in gene content among strains of *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **95**: 13108-13113.
- Amabile-Cuevas, C.F. & Chicurel, M.E. (1992) Bacterial plasmids and gene flux. *Cell.* **70**: 189-199.
- Ambrozic, J., Ostroversnik, A., Starcic, M., Kuhar, I., Grabnar, M. & Zgur-Bertok, D. (1998) *Escherichia coli* CoIV plasmid pRK100: genetic organization, stability and conjugal transfer. *Microbiology.* **144**: 343-352.
- Andrews, S.C., Robinson, A.K. & Rodriguez-Quinones, F. (2003) Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**: 215-237.
- Annane, D., Bellissant, E. & Cavaillon, J.-M. (2005) Septic shock. *Lancet.* **365**: 63-78.
- Ant o, E.M., Li, G., Glodde, S., Homeier, T., Laternus, C., Diehl, I., et al (2008) The chicken as a natural model for extraintestinal infections caused by avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Micob. Pathog.* [Epub ahead of print].
- Bach, S., Buchrieser, C., Prentice, M., Guiyoule, A., Msadek, T. & Carniel, E. (1999) The high-pathogenicity island of *Yersinia enterocolitica* Ye8081 undergoes low-frequency deletion but not precise excision, suggesting recent stabilization in the genome. *Infect. Immun.* **67**: 5091-5099.
- Bachmann, B.J. (1990) Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 8. *Microbiol. Rev.* **54**: 130-197.
- Bahrani-Mougeot, F.K., Buckles, E.L., Lockatell, C.V., Hebel, J.R., Johnson, D.E., Tang, C.M. & Donnenberg, M.S. (2002) Type 1 fimbriae and extracellular polysaccharides are preeminent uropathogenic *Escherichia coli* virulence determinants in the murine urinary tract. *Mol. Microbiol.* **45**: 1079-1093.
- Baquero, F., Bouanchaud, D., Martinez-Perez, M.C. & Fernandez, C. (1978) Microcin plasmids: a group of extrachromosomal elements coding for low-molecular-weight antibiotics in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **135**: 342-347.
- Barbour, S.D., Nagaishi, H., Templin, A. & Clark, A.J. (1970) Biochemical and genetic studies of recombination proficiency in *Escherichia coli*. II. Rec<sup>+</sup> revertants caused by indirect suppression of rec<sup>-</sup> mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **67**: 128-135.
- Barnes, H.J.a.W.B.G. (1999) Colibacillosis. In: *Diseases of poultry*. Gross, W.B. (ed.) Ames: Iowa State University Press, pp. 131-141.
- Barondess, J.J. & Beckwith, J. (1995) *bor* gene of phage lambda, involved in serum resistance, encodes a widely conserved outer membrane lipoprotein. *J. Bacteriol.* **177**: 1247-1253.

- Barron, R.F. & Templeton, D.M. (2002)** Molecular and Cellular Iron Transport: CRC Press.
- Barrow, P.A. & Lovell, M.A. (1989)** Functional homology of virulence plasmids in *Salmonella gallinarum*, *S. pullorum*, and *S. typhimurium*. *Infect. Immun.* **57**: 3136-3141.
- Bastiani, M., Vidotto, M.C. & Horn, F. (2005)** An avian pathogenic *Escherichia coli* isolate induces caspase 3/7 activation in J774 macrophages. *FEMS Microbiol. Lett.* **253**: 133-140.
- Bauerfeind, R., Wieler, L.H., Weiss, R. & Baljer, G. (1992)** Comparative plasmid profile analysis of *Salmonella typhimurium* var. Copenhagen strains from a *Salmonella* outbreak in hospitalized horses. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* **105**: 38-42.
- Bidet, P., Bonacorsi, S., Clermont, O., De Montille, C., Brahimi, N. & Bingen, E. (2005)** Multiple insertional events, restricted by the genetic background, have led to acquisition of pathogenicity island IIJ96-like domains among *Escherichia coli* strains of different clinical origins. *Infect. Immun.* **73**: 4081-4087.
- Bindereif, A. & Neilands, J.B. (1985)** Promoter mapping and transcriptional regulation of the iron assimilation system of plasmid ColV-K30 in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **162**: 1039-1046.
- Binns, M.M., Davies, D.L. & Hardy, K.G. (1979)** Cloned fragments of the plasmid ColV, I-K94 specifying virulence and serum resistance. *Nature.* **279**: 778-781.
- Binns, M.M., Mayden, J. & Levine, R.P. (1982)** Further characterization of complement resistance conferred on *Escherichia coli* by the plasmid genes *traT* of R100 and *iss* of ColV, I-K94. *Infect. Immun.* **35**: 654-659.
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979)** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1523.
- Blattner, F.R., Plunkett, G., 3rd, Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., et al (1997)** The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science.* **277**: 1453-1474.
- Bonacorsi, S., Clermont, O., Houdouin, V., Cordevant, C., Brahimi, N., Marecat, A., et al (2003)** Molecular analysis and experimental virulence of French and North American *Escherichia coli* neonatal meningitis isolates: identification of a new virulent clone. *J. Infect. Dis.* **187**: 1895-1906.
- Bornside, G.H., Bouis, P.J.J. & Cohn, I.J. (1968)** Hemoglobin and *Escherichia coli*, a lethal intraperitoneal combination. *J. Bacteriol.* **95**: 1567-1571.
- Boyd, D.A., Tyler, S., Christianson, S., McGeer, A., Muller, M.P., Willey, B.M., et al (2004)** Complete nucleotide sequence of a 92-kilobase plasmid harboring the CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase involved in an outbreak in long-term-care facilities in Toronto, Canada. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**: 3758-3764.
- Braun, V. (1995)** Energy-coupled transport and signal transduction through the gram-negative outer membrane via TonB-ExbB-ExbD-dependent receptor proteins. *FEMS Microbiol. Rev.* **16**: 295-307.
- Braun, V. (2003)** Iron uptake by *Escherichia coli*. *Front. Biosci.* **8**: 1409-1421.
- Brzuszkiewicz, E., Bruggemann, H., Liesegang, H., Emmerth, M., Olschlager, T., Nagy, G., et al (2006)** How to become a uropathogen: comparative genomic analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **103**: 12879-12884.
- Buchrieser, C., Glaser, P., Rusniok, C., Nedjari, H., D'Hauteville, H., Kunst, F., et al (2000)** The virulence plasmid pWR100 and the repertoire of proteins secreted by the type III secretion apparatus of *Shigella flexneri*. *Mol. Microbiol.* **38**: 760-771.
- Busch, U., Huber, I., Messelhäuser, U., Hörmansdorfer, S. & Sing, A. (2007)** Nachweis Shigatoxin-bildender / Enterohämorrhagischer *Escherichia coli* (STEC / EHEC) mittels Real-Time PCR *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit.* **2**: 144-148.
- Carniel, E. (1999)** The *Yersinia* high-pathogenicity island. *Int. Microbiol.* **2**: 161-167.

- Cashel, M., Gentry, D.R., Hernandez, V.J. & Vinella, D. (1996) *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. In: Washington, D. C: American Society for Microbiology.
- Chen, C.Y., Nace, G.W., Solow, B. & Fratamico, P.M. (2007) Complete sequences of 84.5- and 3.2-kb plasmids in the multi-antibiotic resistant *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium strain G8430. *Plasmid*. **57**: 29-43.
- Chen, S.L., Hung, C.S., Xu, J., Reigstad, C.S., Magrini, V., Sabo, A., et al (2006) Identification of genes subject to positive selection in uropathogenic strains of *Escherichia coli*: a comparative genomics approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. **103**: 5977-5982.
- Chlosta, S., Fishman, D.S., Harrington, L., Johnson, E.E., Knutson, M.D., Wessling-Resnick, M. & Cherayil, B.J. (2006) The iron efflux protein ferroportin regulates the intracellular growth of *Salmonella enterica*. *Infect. Immun.* **74**: 3065-3067.
- Chouikha, I., Germon, P., Bree, A., Gilot, P., Moulin-Schouleur, M. & Schouler, C. (2006) A selC-associated genomic island of the extraintestinal avian pathogenic *Escherichia coli* strain BEN2908 is involved in carbohydrate uptake and virulence. *J. Bacteriol.* **188**: 977-987.
- Chuba, P.J., Leon, M.A., Banerjee, A. & Palchaudhuri, S. (1989) Cloning and DNA sequence of plasmid determinant *iss*, coding for increased serum survival and surface exclusion, which has homology with lambda DNA. *Mol. Gen. Genet.* **216**: 287-292.
- Clancy, J. & Savage, D.C. (1981) Another Colicin V phenotype: in vitro adhesion of *Escherichia coli* to mouse intestinal epithelium. *Infect. Immun.* **32**: 343-352.
- Collins, R.F., Frye, S.A., Balasingham, S., Ford, R.C., Tonjum, T. & Derrick, J.P. (2005) Interaction with type IV pili induces structural changes in the bacterial outer membrane secretin PilQ. *J. Biol. Chem.* **280**: 18923-18930.
- Corsa, J.H. (1999) Iron and Infection: Wiley, John & Sons Ltd.
- Couturier, M., Bex, F., Bergquist, P.L. & Maas, W.K. (1988) Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiol. Rev.* **52**: 375-395.
- Cursino, L., Smarda, J., Chartone-Souza, E. & Nascimento, A.M.A. (2002) Recent updated aspects of colicins of *Enterobacteriaceae*. *Brazilian Journal of Microbiology*. **33**.
- Dale, J.W. & Park, S.F. (2004) Molecular Genetics of Bacteria: John Wiley & Sons Ltd.
- Darken, J. & Savage, D.C. (1987) Influences of conjugal genetic transfer functions of colicin V plasmids on adhesion of *Escherichia coli* to murine intestinal tissue. *Infect. Immun.* **55**: 2483-2489.
- Dasgupta, S., Masukata, H. & Tomizawa, J. (1987) Multiple mechanisms for initiation of ColE1 DNA replication: DNA synthesis in the presence and absence of ribonuclease H. *Cell*. **51**: 1113-1122.
- Daskaleros, P.A., Stoebner, J.A. & Payne, S.M. (1991) Iron uptake in *Plesiomonas shigelloides*: cloning of the genes for the heme-iron uptake system. *Infect. Immun.* **59**: 2706-2711.
- Davies, D.L., Falkiner, F.R. & Hardy, K.G. (1981) Colicin V production by clinical isolates of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **31**: 574-579.
- de Lorenzo, V. & Pugsley, A.P. (1985) Microcin E492, a low-molecular-weight peptide antibiotic which causes depolarization of the *Escherichia coli* cytoplasmic membrane. *Antimicrob. Agents Chemother.* **27**: 666-669.
- Dezfulian, H., Batisson, I., Fairbrother, J.M., Lau, P.C., Nassar, A., Szatmari, G. & Harel, J. (2003) Presence and characterization of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* virulence genes in F165-positive *E. coli* strains isolated from diseased calves and pigs. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 1375-1385.
- Dho-Moulin, M. & Fairbrother, J.M. (1999) Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet. Res.* **30**: 299-316.



- Dho-Moulin, M., van den Bosch, J.F., Girardeau, J.P., Bree, A., Barat, T. & Lafont, J.P. (1990)** Surface antigens from *Escherichia coli* O2 and O78 strains of avian origin. *Infect. Immun.* **58**: 740-745.
- Dobrindt, U. (2005)** (Patho-)Genomics of *Escherichia coli*. *Int. J. Med. Microbiol.* **295**: 357-371.
- Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U. & Hacker, J. (2004)** Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**: 414-424.
- Dobrindt, U., Blum-Oehler, G., Nagy, G., Schneider, G., Johann, A., Gottschalk, G. & Hacker, J. (2002)** Genetic structure and distribution of four pathogenicity islands (PAI I(536) to PAI IV(536)) of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Infect. Immun.* **70**: 6365-6372.
- Donnenberg, M.S. & Whittam, T.S. (2001)** Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J. Clin. Invest.* **107**: 539-548.
- Dozois, C.M., Pourbakhsh, S.A. & Fairbrother, J.M. (1995)** Expression of P and type 1 (F1) fimbriae in pathogenic *Escherichia coli* from poultry. *Vet Microbiol.* **45**: 297-309.
- Dozois, C.M., Daigle, F. & Curtiss, R., 3rd (2002)** Identification of pathogen-specific and conserved genes expressed in vivo by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **100**: 247-252.
- Dozois, C.M., Fairbrother, J.M., Harel, J. & Bosse, M. (1992)** pap- and pil-related DNA sequences and other virulence determinants associated with *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens and turkeys. *Infect. Immun.* **60**: 2648-2656.
- Dozois, C.M., M. Dho-Moulin, A. Bree, J.M. Fairbrother, C. Desautels, and R. Curtiss (2000)** Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli*, and localization and analysis of the genetic region. *Infect. Immun.* **68**: 4145-4154.
- Dutta, P.R., Cappello, R., Navarro-Garcia, F. & Nataro, J.P. (2002)** Functional comparison of serine protease autotransporters of *Enterobacteriaceae*. *Infect. Immun.* **70**: 7105-7113.
- Escolar, L., Perez-Martin, J. & de Lorenzo, V. (2000)** Evidence of an unusually long operator for the fur repressor in the aerobactin promoter of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **275**: 24709-24714.
- Ewers, C., Janssen, T., Kiessling, S., Philipp, H.C. & Wieler, L.H. (2004)** Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. *Vet. Microbiol.* **104**: 91-101.
- Ewers, C., Antão, E.-M., Diehl, I., Philipp, H.C. & Wieler, L.H. (2009)** Intestine and environment of the chicken as reservoirs for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains with zoonotic potential. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 184-192.
- Ewers, C., Li, G., Wilking, H., Kiessling, S., Alt, K., Antao, E.-M., et al (2007)** Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: How closely related are they? *International Journal of Medical Microbiology.* **297**: 163-176.
- Fantinatti, F., Silveira, W.D. & Castro, A.F. (1994)** Characteristics associated with pathogenicity of avian septicemic *Escherichia coli* strains. *Vet. Microbiol.* **41**: 75-86.
- Feldmann, F., Sorsa, L.J., Hildinger, K. & Schubert, S. (2007)** The salmochelin siderophore receptor IroN contributes to invasion of urothelial cells by extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in vitro. *Infect. Immun.* **75**: 3183-3187.
- Fenton, A.C. (1876)** On a new reaction of tartaric acid. *Chem. News.* **30**: 190-191.
- Fernandez-Beros, M.E., Kissel, V., Lior, H. & Cabello, F.C. (1990)** Virulence-related genes in ColV plasmids of *Escherichia coli* isolated from human blood and intestines. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 742-746.
- Finlay, B.B. & Falkow, S. (1997)** Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 136-169.
- Franklin, N.C. (1969)** Mutation in *galU* gene of *E. coli* blocks phage P1 infection. *Virology.* **38**: 189-191.

- Fricke, W.F., Wright, M.S., Lindell, A.H., Harkins, D.M., Baker-Austin, C., Ravel, J. & Stepanauskas, R. (2008)** Insights into the environmental resistance gene pool from the genome sequence of the multidrug-resistant environmental isolate *E.coli* SMS-3-5. *J. Bacteriol.* in press.
- Frohman, M.A., Dush, M.K. & Martin, G.R. (1988)** Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **85**: 8998-9002.
- Gerdes, K., Christensen, S.K. & Lobner-Olesen, A. (2005)** Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**: 371-382.
- Gerdes, K., Gulyaev, A.P., Franch, T., Pedersen, K. & Mikkelsen, N.D. (1997)** Antisense RNA-regulated programmed cell death. *Annu. Rev. Genet.* **31**: 1-31.
- Germon, P., Chen, Y.H., He, L., Blanco, J.E., Bree, A., Schouler, C., et al (2005)** *ibeA*, a virulence factor of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology.* **151**: 1179-1186.
- Germon, P., Roche, D., Melo, S., Mignon-Grasteau, S., Dobrindt, U., Hacker, J., et al (2007)** tDNA locus polymorphism and ecto-chromosomal DNA insertion hot-spots are related to the phylogenetic group of *Escherichia coli* strains. *Microbiology.* **153**: 826-837.
- Ginns, C.A., Browning, G.F., Benham, M.L. & Whithear, K.G. (1998)** Development and application of an aerosol challenge method for reproduction of avian colibacillosis. *Avian Pathol.* **27**: 505-511.
- Ginns, C.A., Benham, M.L., Adams, L.M., Whithear, K.G., Bettelheim, K.A., Crabb, B.S. & Browning, G.F. (2000)** Colonization of the respiratory tract by a virulent strain of avian *Escherichia coli* requires carriage of a conjugative plasmid. *Infect. Immun.* **68**: 1535-1541.
- Girardeau, J.P., Lalioui, L., Said, A.M., De Champs, C. & Le Bouguenec, C. (2003)** Extended virulence genotype of pathogenic *Escherichia coli* isolates carrying the *afa-8* operon: evidence of similarities between isolates from humans and animals with extraintestinal infections. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 218-226.
- Gomez-Duarte, O.G. & Kaper, J.B. (1995)** A plasmid-encoded regulatory region activates chromosomal *aeaA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **63**: 1767-1776.
- Goodson, M. & Rowbury, R.J. (1987)** Altered phage P1 attachment to strains of *Escherichia coli* carrying the plasmid ColV, I-K94. *J. Gen. Virol.* **68 (Pt 7)**: 1785-1789.
- Gophna, U., Parket, A., Hacker, J. & Ron, E.Z. (2003)** A novel ColV plasmid encoding type IV pili. *Microbiology.* **149**: 177-184.
- Gottesman, S., McCullen, C.A., Guillier, M., Vanderpool, C.K., Majdalani, N., Benhammou, J., et al (2006)** Small RNA regulators and the bacterial response to stress. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **71**: 1-11.
- Graham, M.Y., Tal, M. & Schlessinger, D. (1982)** *lac* Transcription in *Escherichia coli* cells treated with chloramphenicol. *J. Bacteriol.* **151**: 251-261.
- Griffiths, E. & Williams, P. (1999)** Iron and infection. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, England.
- Gross, W.B. (1994)** Diseases due to *Escherichia coli* in poultry. In: *Escherichia coli* in domestic animals and humans. Gyles, C.L. (ed.): CAB International: Wallingford, UK, pp. 237-259.
- Grozdanov, L., Raasch, C., Schulze, J., Sonnenborn, U., Gottschalk, G., Hacker, J. & Dobrindt, U. (2004)** Analysis of the genome structure of the nonpathogenic probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *J. Bacteriol.* **186**: 5432-5441.
- Guijarro, J.I., Gonzalez-Pastor, J.E., Baleux, F., San Millan, J.L., Castilla, M.A., Rico, M., et al (1995)** Chemical structure and translation inhibition studies of the antibiotic microcin C7. *J. Biol. Chem.* **270**: 23520-23532.

- Guiney, D.G. (1993)** Broad host range conjugative and mobilizable plasmids in Gram-negative Bacteria. New York: Plenum Press.
- Guyer, D.M., Kao, J.S. & Mobley, H.L. (1998)** Genomic analysis of a pathogenicity island in uropathogenic *Escherichia coli* CFT073: distribution of homologous sequences among isolates from patients with pyelonephritis, cystitis, and Catheter-associated bacteriuria and from fecal samples. *Infect. Immun.* **66**: 4411-4417.
- Haber, F. & Weiss, J. (1932)** Über die Katalyse des Hydroperoxides. *Naturwissenschaft.* **30**: 948-950.
- Hacker, J. & Kaper, J.B. (2000)** Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**: 641-679.
- Hacker, J. & Carniel, E. (2001)** Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes. *EMBO Rep.* **2**: 376-381.
- Hacker, J., Blum-Oehler, G., Muhldorfer, I. & Tschape, H. (1997)** Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol. Microbiol.* **23**: 1089-1097.
- Hantke, K., Nicholson, G., Rabsch, W. & Winkelmann, G. (2003)** Salmochelins, siderophores of *Salmonella enterica* and uropathogenic *Escherichia coli* strains, are recognized by the outer membrane receptor IroN. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**: 3677-3682.
- Hardy, K.G. (1975)** Colicinogeny and related phenomena. *Bacteriol. Rev.* **39**: 464-515.
- Haugen, B.J., Pellett, S., Redford, P., Hamilton, H.L., Roesch, P.L. & Welch, R.A. (2007)** In vivo gene expression analysis identifies genes required for enhanced colonization of the mouse urinary tract by uropathogenic *Escherichia coli* strain CFT073 dsdA. *Infect. Immun.* **75**: 278-289.
- Heimer, S.R., Rasko, D.A., Lockett, C.V., Johnson, D.E. & Mobley, H.L. (2004)** Autotransporter genes *pic* and *tsh* are associated with *Escherichia coli* strains that cause acute pyelonephritis and are expressed during urinary tract infection. *Infect. Immun.* **72**: 593-597.
- Helinski, D.R., Toukdarian, A.E. & Novick, A.P. (eds.) (1996)** *EcoSal-Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* In: Cellular and molecular biology. Washington: ASM Press.
- Hernandez, V.J. & Bremer, H. (1993)** Characterization of RNA and DNA synthesis in *Escherichia coli* strains devoid of ppGpp. *J. Biol. Chem.* **268**: 10851-10862.
- Herschman, H.R. & Helinski, D.R. (1967)** Purification and characterization of colicin E2 and colicin E3. *J. Biol. Chem.* **242**: 5360-5368.
- Herzer, P.J., Inouye, S., Inouye, M. & Whittam, T.S. (1990)** Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**: 6175-6181.
- Hirota, Y. (1959)** The effect of acridine dyes on mating type factors in *Escherichia coli*. *Genetics.* **46**: 57-64.
- Hochhut, B., Dobrindt, U. & Hacker, J. (2006)** Evolution of microbial pathogens. Washington, D. C.: ASM Press.
- Hochhut, B., Jahreis, K., Lengeler, J.W. & Schmid, K. (1997)** CTnscr94, a conjugative transposon found in *Enterobacteria*. *J. Bacteriol.* **179**: 2097-2102.
- Houdouin, V., Bonacorsi, S., Brahimi, N., Clermont, O., Nassif, X. & Bingen, E. (2002)** A uropathogenicity island contributes to the pathogenicity of *Escherichia coli* strains that cause neonatal meningitis. *Infect. Immun.* **70**: 5865-5869.
- Huang, S.H., Chen, Y.H., Kong, G., Chen, S.H., Besemer, J., Borodovsky, M. & Jong, A. (2001)** A novel genetic island of meningitic *Escherichia coli* K1 containing the *ibeA* invasion gene (GimA): functional annotation and carbon-source-regulated invasion of human brain microvascular endothelial cells. *Funct. Integr. Genomics.* **1**: 312-322.
- Hughes, V.M. & Datta, N. (1983)** Conjugative plasmids in bacteria of the 'pre-antibiotic' era. *Nature.* **302**: 725-726.

- Ike, K., Kawahara, K., Danbara, H. & Kume, K. (1992)** Serum resistance and aerobactin iron uptake in avian *Escherichia coli* mediated by conjugative 100-megadalton plasmid. *J. Vet. Med. Sci.* **54**: 1091-1098.
- Ikeda, J.S., Janakiraman, A., Kehres, D.G., Maguire, M.E. & Slauch, J.M. (2005)** Transcriptional regulation of *sitABCD* of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by MntR and Fur. *J. Bacteriol.* **187**: 912-922.
- Inoue, N. & Uchida, H. (1991)** Transcription and initiation of ColE1 DNA replication in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **173**: 1208-1214.
- Inuzuka, N., Nakamura, S., Inuzuka, M. & Tomoeda, M. (1969)** Specific action of sodium dodecyl sulfate on the sex factor of *Escherichia coli* K-12 Hfr strains. *Journal of Bacteriology.* **100**: 827-835.
- Janakiraman, A. & Slauch, J.M. (2000)** The putative iron transport system SitABCD encoded on SPI1 is required for full virulence of *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* **35**: 1146-1155.
- Janke, B., Dobrindt, U., Hacker, J. & Blum-Oehler, G. (2001)** A subtractive hybridisation analysis of genomic differences between the uropathogenic *E. coli* strain 536 and the *E. coli* K-12 strain MG1655. *FEMS Microbiol. Lett.* **199**: 61-66.
- Janßen, T., Schwarz, C., Preikschat, P., Voss, M., Philipp, H.C. & Wieler, L.H. (2001)** Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis. *Int. J. Med. Microbiol.* **291**: 371-378.
- Jeffrey, J.S., Nolan, L.K., Tonooka, K.H., Wolfe, S., Giddings, C.W., Horne, S.M., et al (2002)** Virulence factors of *Escherichia coli* from cellulitis or colisepticemia lesions in chickens. *Avian Dis.* **46**: 48-52.
- Jerse, A.E., Yu, J., Tall, B.D. & Kaper, J.B. (1990)** A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **87**: 7839-7843.
- Jeziorowski, A. & Gordon, D.M. (2007)** Evolution of microcin V and colicin Ia plasmids in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **189**: 7045-7052.
- Johnson, J.R. & Russo, T.A. (2002)** Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "the other bad *E. coli*". *J. Lab. Clin. Med.* **139**: 155-162.
- Johnson, J.R., Delavari, P. & O'Bryan, T.T. (2001a)** *Escherichia coli* O18:K1:H7 isolates from patients with acute cystitis and neonatal meningitis exhibit common phylogenetic origins and virulence factor profiles. *J. Infect. Dis.* **183**: 425-434.
- Johnson, J.R., Stell, A.L. & Delavari, P. (2001b)** Canine feces as a reservoir of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **69**: 1306-1314.
- Johnson, J.R., Kuskowski, M.A., O'Bryan, T.T. & Maslow, J.N. (2002a)** Epidemiological correlates of virulence genotype and phylogenetic background among *Escherichia coli* blood isolates from adults with diverse-source bacteremia. *J. Infect. Dis.* **185**: 1439-1447.
- Johnson, J.R., Kaster, N., Kuskowski, M.A. & Ling, G.V. (2003a)** Identification of urovirulence traits in *Escherichia coli* by comparison of urinary and rectal *E. coli* isolates from dogs with urinary tract infection. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 337-345.
- Johnson, J.R., Kuskowski, M.A., Owens, K., Gajewski, A. & Winokur, P.L. (2003b)** Phylogenetic origin and virulence genotype in relation to resistance to fluoroquinolones and/or extended-spectrum cephalosporins and cephamycins among *Escherichia coli* isolates from animals and humans. *J. Infect. Dis.* **188**: 759-768.
- Johnson, J.R., Kuskowski, M.A., Smith, K., O'Bryan, T.T. & Tatini, S. (2005a)** Antimicrobial-resistant and extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in retail foods. *J. Infect. Dis.* **191**: 1040-1049.

- Johnson, J.R., Kuskowski, M.A., Menard, M., Gajewski, A., Xercavins, M. & Garau, J. (2006a)** Similarity between human and chicken *Escherichia coli* isolates in relation to ciprofloxacin resistance status. *J. Infect. Dis.* **194**: 71-78.
- Johnson, J.R., O'Bryan, T.T., Low, D.A., Ling, G., Delavari, P., Fasching, C., et al (2000)** Evidence of commonality between canine and human extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains that express papG allele III. *Infect. Immun.* **68**: 3327-3336.
- Johnson, T.J. & Nolan, L.K. (2004)** *Escherichia coli* strain A2363 plasmid pTJ100 iron acquisition operon, complete sequence. In: *Aerobactin iron acquisition operon in avian pathogenic Escherichia coli*: NCBI, direct submission.
- Johnson, T.J. & Nolan, L.K. (2009)** pAPEC-O103-ColBM, an *Escherichia coli* ColV plasmid conferring multidrug resistance, bacterial fitness, and extraintestinal virulence. *NCBI, direct submission*.
- Johnson, T.J., Johnson, S.J. & Nolan, L.K. (2006b)** Complete DNA sequence of a ColBM plasmid from avian pathogenic *Escherichia coli* suggests that it evolved from closely related ColV virulence plasmids. *J. Bacteriol.* **188**: 5975-5983.
- Johnson, T.J., Wannemuehler, Y.M. & Nolan, L.K. (2008)** Evolution of the *iss* gene in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*
- Johnson, T.J., Siek, K.E., Johnson, S.J. & Nolan, L.K. (2005b)** DNA sequence and comparative genomics of pAPEC-O2-R, an avian pathogenic *Escherichia coli* transmissible R plasmid. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 4681-4688.
- Johnson, T.J., Siek, K.E., Johnson, S.J. & Nolan, L.K. (2006c)** DNA sequence of a ColV plasmid and prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian *Escherichia coli* strains. *J. Bacteriol.* **188**: 745-758.
- Johnson, T.J., Wannemuehler, Y.M., Scaccianoce, J.A., Johnson, S.J. & Nolan, L.K. (2006d)** Complete DNA sequence, comparative genomics, and prevalence of an IncHI2 plasmid occurring among extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**: 3929-3933.
- Johnson, T.J., Wannemuehler, Y.M., Johnson, S.J., Logue, C.M., White, D.G., Doetkott, C. & Nolan, L.K. (2007a)** Plasmid replicon typing of commensal and pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 1976-1983.
- Johnson, T.J., Kariyawasam, S., Wannemuehler, Y., Mangiamale, P., Johnson, S.J., Doetkott, C., et al (2007b)** The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1:H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic *E. coli* genomes. *J. Bacteriol.* **189**: 3228-3236.
- Johnson, T.J., Giddings, C.W., Horne, S.M., Gibbs, P.S., Wooley, R.E., Skyberg, J., et al (2002b)** Location of increased serum survival gene and selected virulence traits on a conjugative R plasmid in an avian *Escherichia coli* isolate. *Avian Dis.* **46**: 342-352.
- Jores, J., Rumer, L., Kiessling, S., Kaper, J.B. & Wieler, L.H. (2001)** A novel locus of enterocyte effacement (LEE) pathogenicity island inserted at *pheV* in bovine Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strain O103:H2. *FEMS Microbiol. Lett.* **204**: 75-79.
- Kado, C.I. & Liu, S.-T. (1981)** Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* **145**: 1365-1373.
- Kammler, M., Schon, C. & Hantke, K. (1993)** Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**: 6212-6219.
- Kao, J.S., Stucker, D.M., Warren, J.W. & Mobley, H.L. (1997)** Pathogenicity island sequences of pyelonephritogenic *Escherichia coli* CFT073 are associated with virulent uropathogenic strains. *Infect. Immun.* **65**: 2812-2820.
- Kariyawasam, S., Johnson, T.J. & Nolan, L.K. (2006a)** The *pap* operon of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1 is located on a novel pathogenicity island. *Infect. Immun.* **74**: 744-749.

- Kariyawasam, S., Johnson, T.J., Debroy, C. & Nolan, L.K. (2006b)** Occurrence of pathogenicity island I (APEC-O1) genes among *Escherichia coli* implicated in avian colibacillosis. *Avian Dis.* **50**: 405-410.
- Karmali, M.A., Petric, M., Lim, C., Fleming, P.C. & Steele, B.T. (1983)** *Escherichia coli* cytotoxin, haemolytic-uraemic syndrome, and haemorrhagic colitis. *Lancet.* **2**: 1299-1300.
- Kehres, D.G. & Maguire, M.E. (2003)** Emerging themes in manganese transport, biochemistry and pathogenesis in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**: 263-290.
- Kehres, D.G., Janakiraman, A., Slauch, J.M. & Maguire, M.E. (2002a)** SitABCD is the alkaline Mn<sup>(2+)</sup> transporter of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* **184**: 3159-3166.
- Kehres, D.G., Janakiraman, A., Slauch, J.M. & Maguire, M.E. (2002b)** Regulation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium mntH transcription by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Fe<sup>(2+)</sup>, and Mn<sup>(2+)</sup>. *J. Bacteriol.* **184**: 3151-3158.
- Kim, K.S. (2001)** *Escherichia coli* translocation at the blood-brain barrier. *Infect. Immun.* **69**: 5217-5222.
- Kim, K.S. (2003)** Pathogenesis of bacterial meningitis: from bacteraemia to neuronal injury. *Nat.Rev.Neurosci.* **4**: 376-385.
- Kimberlin, D.W. (2002)** Meningitis in the Neonate. *Curr. Treat. Options Neurol.* **4**: 239-248.
- Kornberg, A. & Scott, J.F. (1978)** Purification of the rep protein of *Escherichia coli*. An ATPase which separates duplex DNA strands in advance of replication. *J. Biol. Chem.* **253**: 3292-3297.
- Kostakioti, M. & Stathopoulos, C. (2004)** Functional analysis of the Tsh autotransporter from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infect. Immun.* **72**: 5548-5554.
- Lacatena, R.M. & Cesareni, G. (1981)** Base pairing of RNA I with its complementary sequence in the primer precursor inhibits ColE1 replication. *Nature.* **294**: 623-626.
- Lagos, R., Wilkens, M., Vergara, C., Cecchi, X. & Monasterio, O. (1993)** Microcin E492 forms ion channels in phospholipid bilayer membrane. *FEBS Lett.* **321**: 145-148.
- Lawlor, K.M. & Payne, S.M. (1984)** Aerobactin genes in *Shigella* spp. *J. Bacteriol.* **160**: 266-272.
- Le Gall, T., Clermont, O., Gouriou, S., Picard, B., Nassif, X., Denamur, E. & Tenaillon, O. (2007)** Extraintestinal virulence is a coincidental by-product of commensalism in B2 phylogenetic group *Escherichia coli* strains. *Mol. Biol. Evol.* **24**: 2373-2384.
- Lee, J.W. & Helmann, J.D. (2007)** Functional specialization within the Fur family of metalloregulators. *Biomaterials.* **20**: 485-499.
- Levy, S.B. (1982)** Microbial resistance to antibiotics. An evolving and persistent problem. *Lancet.* **2**: 83-88.
- Levy, S.B. & Marshall, B. (2004)** Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat. Med.* **10**: S122-129.
- Li, G., Laturus, C., Ewers, C. & Wieler, L.H. (2005)** Identification of genes required for avian *Escherichia coli* septicemia by signature-tagged mutagenesis. *Infect. Immun.* **73**: 2818-2827.
- Lilley, A.K., Young, P. & Bailey, M. (2000)** Bacterial population genetics: Do plasmids maintain bacterial diversity and adaptation. Amsterdam: Harwood Academic Publishers.
- Lynne, A.M., Skyberg, J.A., Logue, C.M., Doetkott, C., Foley, S.L. & Nolan, L.K. (2007)** Characterization of a series of transconjugant mutants of an avian pathogenic *Escherichia coli* isolate for resistance to serum complement. *Avian Dis.* **51**: 771-776.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. & Parker, J. (2001)** Brock Mikrobiologie. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Marrs, C.F., Zhang, L., Tallman, P., Manning, S.D., Somsel, P., Raz, P., et al (2002)** Variations in 10 putative uropathogen virulence genes among urinary, faecal and peri-urethral *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.* **51**: 138-142.

- Martin, G.S., Mannino, D.M., Eaton, S. & Moss, M. (2003)** The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N. Engl. J. Med.* **348**: 1546-1554.
- Masse, E. & Gottesman, S. (2002)** A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **99**: 4620-4625.
- Masse, E., Majdalani, N. & Gottesman, S. (2003)** Regulatory roles for small RNAs in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**: 120-124.
- Maurer, J.J., Brown, T.P., Steffens, W.L. & Thayer, S.G. (1998)** The occurrence of ambient temperature-regulated adhesins, curli, and the temperature-sensitive hemagglutinin *tsh* among avian *Escherichia coli*. *Avian Dis.* **42**: 106-118.
- Maynard, C., Bekal, S., Sanschagrin, F., Levesque, R.C., Brousseau, R., Masson, L., et al (2004)** Heterogeneity among virulence and antimicrobial resistance gene profiles of extraintestinal *Escherichia coli* isolates of animal and human origin. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 5444-5452.
- McKenzie, G.J., Harris, R.S., Lee, P.L. & Rosenberg, S.M. (2000)** The SOS response regulates adaptive mutation: Proc. Natl. Acad. Sci. USA.
- Mekalanos, J.J. (1992)** Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J. Bacteriol.* **174**: 1-7.
- Mellata, M., Touchman, J.W. & Curtiss, R. (2009)** Full sequence and comparative analysis of the plasmid pAPEC-1 of avian pathogenic *E. coli* chi7122 (O78:K80:H9). *PLoS ONE* **4**.
- Mellata, M., Dho-Moulin, M., Dozois, C.M., Curtiss, R., 3rd, Lehoux, B. & Fairbrother, J.M. (2003)** Role of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence factors in bacterial interaction with chicken heterophils and macrophages. *Infect. Immun.* **71**: 494-503.
- Miller, V.L. & Mekalanos, J.J. (1988)** A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. *J. Bacteriol.* **170**: 2575-2583.
- Minkley, E.G., Jr. & Ippen-Ihler, K. (1977)** Identification of a membrane protein associated with expression of the surface exclusion region of the F-transfer operon. *J. Bacteriol.* **129**: 1613-1622.
- Mokady, D., Gophna, U. & Ron, E.Z. (2005a)** Virulence factors of septicemic *Escherichia coli* strains. *Int. J. Med. Microbiol.* **295**: 455-462.
- Mokady, D., Gophna, U. & Ron, E.Z. (2005b)** Extensive gene diversity in septicemic *Escherichia coli* strains. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 66-73.
- Montenegro, M.A., Morelli, G. & Helmuth, R. (1991)** Heteroduplex analysis of *Salmonella* virulence plasmids and their prevalence in isolates of defined sources. *Microb. Pathog.* **11**: 391-397.
- Morales, C., Lee, M.D., Hofacre, C. & Maurer, J.J. (2004)** Detection of a novel virulence gene and a *Salmonella* virulence homologue among *Escherichia coli* isolated from broiler chickens. *Foodborne Pathog. Dis.* **1**: 160-165.
- Morita, M. & Oka, A. (1979)** The structure of a transcriptional unit on colicin E1 plasmid. *Eur. J. Biochem.* **97**: 435-443.
- Moss, J.E., Cardozo, T.J., Zychlinsky, A. & Groisman, E.A. (1999)** The selC-associated SHI-2 pathogenicity island of *Shigella flexneri*. *Mol. Microbiol.* **33**: 74-83.
- Moulin-Schouleir, M., Schouler, C., Tailliez, P., Kao, M.R., Bree, A., Germon, P., et al (2006)** Common Virulence Factors and Genetic Relationships between O18:K1:H7 *Escherichia coli* Isolates of Human and Avian Origin. *J Clin Microbiol.* **44**: 3484-3492.
- Murphy, K.C. (1998)** Use of bacteriophage  $\lambda$  recombination functions to promote gene replacement in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**: 2063-2071.
- Nataro, J.P. & Kaper, J.B. (1998)** Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**: 142-201.

- Nataro, J.P., Seriwatana, J., Fasano, A., Maneval, D.R., Guers, L.D., Noriega, F., et al (1995)** Identification and cloning of a novel plasmid-encoded enterotoxin of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* strains. *Infect. Immun.* **63**: 4721-4728.
- NCBI National Center for Biotechnology Information.** [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>]
- Negre, V.L., Bonacorsi, S., Schubert, S., Bidet, P., Nassif, X. & Bingen, E. (2004)** The siderophore receptor IroN, but not the high-pathogenicity island or the hemin receptor ChuA, contributes to the bacteremic step of *Escherichia coli* neonatal meningitis. *Infect. Immun.* **72**: 1216-1220.
- Neilands, J.B. (1995)** Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Biol. Chem.* **270**: 26723-26726.
- Nies, D., Mergeay, M., Friedrich, B. & Schlegel, H.G. (1987)** Cloning of plasmid genes encoding resistance to cadmium, zinc, and cobalt in *Alcaligenes eutrophus* CH34. *J. Bacteriol.* **169**: 4865-4868.
- Nolan, L.K., Horne, S.M., Giddings, C.W., Foley, S.L., Johnson, T.J., Lynne, A.M. & Skyberg, J. (2003)** Resistance to serum complement, *iss*, and virulence of avian *Escherichia coli*. *Vet. Res. Commun.* **27**: 101-110.
- Oelschlaeger, T.A., Zhang, D., Schubert, S., Carniel, E., Rabsch, W., Karch, H. & Hacker, J. (2003)** The high-pathogenicity island is absent in human pathogens of *Salmonella enterica* subspecies I but present in isolates of subspecies III and VI. *J. Bacteriol.* **185**: 1107-1111.
- Oka, A., Sugisaki, H. & Takanami, M. (1981)** Nucleotide sequence of the kanamycin resistance transposon *Tn903*. *J. Mol. Biol.* **147**: 217-226.
- Ornellas, E.P. & Stocker, B.A.** Relation of lipopolysaccharide character to P1 sensitivity in *Salmonella typhimurium*. *Virology.* **60**: 491-502.
- Osborn, M. (2000)** The evolution of bacterial plasmids. Amsterdam: Harwood, Academic Publisher.
- Otto, B.R. (1998)** *Escherichia coli* DNA for plasmid pColV-K30. In: *NCBI*, direct Submission.
- Otto, B.R., van Dooren, S.J., Nuijens, J.H., Luirink, J. & Oudega, B. (1998)** Characterization of a hemoglobin protease secreted by the pathogenic *Escherichia coli* strain EB1. *J. Exp. Med.* **188**: 1091-1103.
- Otto, B.R., van Dooren, S.J., Dozois, C.M., Luirink, J. & Oudega, B. (2002)** *Escherichia coli* hemoglobin protease autotransporter contributes to synergistic abscess formation and heme-dependent growth of *Bacteroides fragilis*. *Infect. Immun.* **70**: 5-10.
- Parkhill, J., Dougan, G., James, K.D., Thomson, N.R., Pickard, D., Wain, J., et al (2001)** Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature.* **413**: 848-852.
- Payne, S.M. (1989)** Iron and virulence in *Shigella*. *Mol. Microbiol.* **3**: 1301-1306.
- Pellen, M. (2004)** Bacterial pathogenesis and genomics unit. *Infect. Immun.*
- Picard, B., Garcia, J.S., Gouriou, S., Duriez, P., Brahimi, N., Bingen, E., et al (1999)** The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infect. Immun.* **67**: 546-553.
- Pourbakhsh, S.A., Boulianne, M., Martineau-Doize, B., Dozois, C.M., Desautels, C. & Fairbrother, J.M. (1997)** Dynamics of *Escherichia coli* infection in experimentally inoculated chickens. In: *Avian Dis.*, pp. 221-233.
- Provence, D.L. & Curtiss, R., 3rd (1994)** Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infect. Immun.* **62**: 1369-1380.
- Quackenbush, R.L. & Falkow, S. (1979)** Relationship between colicin V activity and virulence in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **24**: 562-564.



- Raleigh, E.A., Murray, N.E., Revel, H., Blumenthal, R.M., Westaway, D., Reith, A.D., et al (1988) McrA and McrB restriction phenotypes of some *E. coli* strains and implications for gene cloning. *Nucleic. Acids Res.* **16**: 1563-1575.
- Rasko, D.A., Phillips, J.A., Li, X. & Mobley, H.L. (2001) Identification of DNA sequences from a second pathogenicity island of uropathogenic *Escherichia coli* CFT073: probes specific for uropathogenic populations. *J. Infect. Dis.* **184**: 1041-1049.
- Ratledge, C. & Dover, L.G. (2000) Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**: 881-941.
- Ravatt, R., Studer, S., Zehnder, A.J. & van der Meer, J.R. (1998) Int-B13, an unusual site-specific recombinase of the bacteriophage P4 integrase family, is responsible for chromosomal insertion of the 105-kilobase *clc* element of *Pseudomonas* sp. Strain B13. *J. Bacteriol.* **180**: 5505-5514.
- Ravel, J., Fricke, W.F., White, D., McDermott, P., Mammel, M., Rosovitz, M., et al (2008) *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Kentucky str. CVM29188 plasmid pCVM29188\_146, complete sequence. In: NCBI, direct submission.
- Reingold, J., Starr, N., Maurer, J. & Lee, M.D. (1999) Identification of a new *Escherichia coli* She haemolysin homolog in avian *E. coli*. *Vet. Microbiol.* **66**: 125-134.
- Ricci, J.C.D. & Hernandez, M.E. (2000) Plasmid effects on *Escherichia coli* metabolism. *Critical Reviews in Biotechnology.* **20**: 79-108.
- Riva, S., Fietta, A., Berti, M., Silvestri, L.G. & Romero, E. (1973) Relationships between curing of the F episome by rifamin and by acridine orange in *Escherichia coli*. *Agents of Chemotherapy.* **3**: 456-462.
- Rodrigues, V.S., Vidotto, M.C., Felipe, I., Santos, D.S. & Gaziri, L.C. (1999) Apoptosis of murine peritoneal macrophages induced by an avian pathogenic strain of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **179**: 73-78.
- Rodriguez-Siek, K.E., Giddings, C.W., Doetkott, C., Johnson, T.J., Fakhr, M.K. & Nolan, L.K. (2005) Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Microbiology.* **151**: 2097-2110.
- Ron, E.Z. (2006) Host specificity of septicemic *Escherichia coli*: human and avian pathogens. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**: 28-32.
- Rose, R.E. (1988) The nucleotide sequence of pACYC184. *Nucleic. Acids Res.* **16**: 355.
- Russo, T.A. & Johnson, J.R. (2000) Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J. Infect. Dis.* **181**: 1753-1754.
- Russo, T.A. & Johnson, J.R. (2003) Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infect.* **5**: 449-456.
- Russo, T.A., Carlino, U.B. & Johnson, J.R. (2001) Identification of a new iron-regulated virulence gene, *ireA*, in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **69**: 6209-6216.
- Russo, T.A., McFadden, C.D., Carlino-MacDonald, U.B., Beanan, J.M., Barnard, T.J. & Johnson, J.R. (2002) IroN functions as a siderophore receptor and is a urovirulence factor in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **70**: 7156-7160.
- Rutherford, K., Parkhill, J., Crook, J., Horsnell, T., Rice, P., Rajandream, M.A. & Barrell, B. (2000) Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics.* **16**: 944-945.
- Rychlik, I., Gregorova, D. & Hradecka, H. (2006) Distribution and function of plasmids in *Salmonella enterica*. *Vet. Microbiol.* **112**: 1-10.
- Sabri, M., Leveille, S. & Dozois, C.M. (2006) A SitABCD homologue from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain mediates transport of iron and manganese and resistance to hydrogen peroxide. *Microbiology.* **152**: 745-758.

- Sambrook, J.G. & Russell, D. (2001)** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. In: New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sampei, G. & Mizobuchi, K. (2000)** Organization and diversification of plasmid genomes: complete nucleotide sequence of the R100 genome. In: NCBI, direct submission.
- Sanger, F. & Coulson, A.R. (1975)** A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **94**: 441-448.
- Schneider, G., Dobrindt, U., Bruggemann, H., Nagy, G., Janke, B., Blum-Oehler, G., et al (2004)** The pathogenicity island-associated K15 capsule determinant exhibits a novel genetic structure and correlates with virulence in uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Infect. Immun.* **72**: 5993-6001.
- Schouler, C., Refour, P., Germon, P. & Moulin-Schouleur, M. (2006)** Implication in the virulence of the avian pathogenic strain BEN2908 of a genomic island located near *aspV*. In: unpublished.
- Schouler, C., Koffmann, F., Amory, C., Leroy-Setrin, S. & Moulin-Schouleur, M. (2004)** Genomic subtraction for the identification of putative new virulence factors of an avian pathogenic *Escherichia coli* strain of O2 serogroup. *Microbiology.* **150**: 2973-2984.
- Schubert, S., Rakin, A., Karch, H., Carniel, E. & Heesemann, J. (1998)** Prevalence of the "high-pathogenicity island" of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. *Infect. Immun.* **66**: 480-485.
- Schwyn, B. & Neilands, J.B. (1987)** Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* **160**: 47-56.
- Selander, R.K., Caugant, D.A., Ochman, H., Musser, J.M., Gilmour, M.N. & Whittam, T.S. (1986)** Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**: 873-884.
- Shuman, S. (1994)** Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J. Biol. Chem.* **269**: 32678-32684.
- Silver, S. & Walderhaug, M. (2008)** Gene regulation of plasmid- and chromosome-determined inorganic ion transport in bacteria. In: [www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=372861](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=372861).
- Simons, R.W., Houman, F. & Kleckner, N. (1987)** Improved single and multicopy *lac*-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene.* **53**: 85-96.
- Skurray, R., Naguishi, H. & Clark, A. (1976)** Molecular cloning of DNA from F sex factor of *Escherichia coli* K12: Proc. Nat. Acad. Sci. USA.
- Skyberg, J.A., Johnson, T.J. & Nolan, L.K. (2008)** Mutational and transcriptional analyses of an avian pathogenic *Escherichia coli* ColV plasmid. *BMC Microbiol.* **8**: 24.
- Skyberg, J.A., Johnson, T.J., Johnson, J.R., Clabots, C., Logue, C.M. & Nolan, L.K. (2006)** Acquisition of avian pathogenic *Escherichia coli* plasmids by a commensal *E. coli* isolate enhances its abilities to kill chicken embryos, grow in human urine, and colonize the murine kidney. *Infect. Immun.* **74**: 6287-6292.
- Smith, H.W. & Huggins, M.B. (1976)** Further observations on the association of the colicin V plasmid of *Escherichia coli* with pathogenicity and with survival in the alimentary tract. *J. Gen. Microbiol.* **92**: 335-350.
- Sonstein, S.A. & Baldwin, J.N. (1972)** Loss of the penicillinase plasmid after treatment of *Staphylococcus aureus* with sodium dodecyl sulfate. *J. Bacteriol.* **109**: 262-265.
- Sorensen, P. (1997)** Bei Legehennen gehen wichtige Gene verloren: eine Fallgeschichte. In: *Nutztierhaltung Heft 3/98*.
- Sorsa, L.J., Dufke, S., Heesemann, J. & Schubert, S. (2003)** Characterization of an *iroBCDEN* gene cluster on a transmissible plasmid of uropathogenic *Escherichia coli*: evidence for horizontal transfer of a chromosomal virulence factor. *Infect. Immun.* **71**: 3285-3293.

- Starcić Erjavec, M., Gastra, W., van Putten, J.P.M. & Zgur-Bertok, D. (2003)** Characterization of *Escherichia coli* plasmid pRK100. In: NCBI, direct submission.
- Stathopoulos, C., Provence, D.L. & Curtiss, R., 3rd (1999)** Characterization of the avian pathogenic *Escherichia coli* hemagglutinin Tsh, a member of the immunoglobulin A protease-type family of autotransporters. *Infect. Immun.* **67**: 772-781.
- Stehling, E.G., Yano, T., Brocchi, M. & da Silveira, W.D. (2003)** Characterization of a plasmid-encoded adhesin of an avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strain isolated from a case of swollen head syndrome (SHS). *Vet. Microbiol.* **95**: 111-120.
- Stoll, B.J., Hansen, N.I., Higgins, R.D., Fanaroff, A.A., Duara, S., Goldberg, R., et al (2005)** Very low birth weight preterm infants with early onset neonatal sepsis: the predominance of gram-negative infections continues in the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network, 2002-2003. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **24**: 635-639.
- Sullivan, J.T. & Ronson, C.W. (1998)** Evolution of rhizobia by acquisition of a 500 kb symbiosis island that integrates into the phe-tRNA gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*
- Swenson, D.L., Bukanov, N.O., Berg, D.E. & Welch, R.A. (1996)** Two pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* J96: cosmid cloning and sample sequencing. *Infect. Immun.* **64**: 3736-3743.
- Thomas, C.M. (2000)** The horizontal gene pool. Bacterial plasmids and gene spread. Amsterdam: Harwood Academic Publishers.
- Tivendale, K.A., Allen, J.L. & Browning, G.F. (2005)** *Escherichia coli* plasmid pVM01, complete sequence. In: NCBI, direct submission.
- Tivendale, K.A., Allen, J.L., Ginns, C.A., Crabb, B.S. & Browning, G.F. (2004)** Association of *iss* and *iucA*, but not *tsh*, with plasmid-mediated virulence of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **72**: 6554-6560.
- Tomizawa, J. (1984)** Control of ColE1 plasmid replication: the process of binding of RNA I to the primer transcript. *Cell.* **38**: 861-870.
- Tomizawa, J. & Som, T. (1984)** Control of ColE1 plasmid replication: enhancement of binding of RNA I to the primer transcript by the Rom protein. *Cell.* **38**: 871-878.
- Torres, A.G. & Payne, S.M. (1997)** Haem iron-transport system in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol. Microbiol.* **23**: 825-833.
- Torres, A.G., Redford, P., Welch, R.A. & Payne, S.M. (2001)** TonB-dependent systems of uropathogenic *Escherichia coli*: aerobactin and heme transport and TonB are required for virulence in the mouse. *Infect. Immun.* **69**: 6179-6185.
- Valdebenito, M., Crumbliss, A.L., Winkelmann, G. & Hantke, K. (2006)** Environmental factors influence the production of enterobactin, salmochelin, aerobactin, and yersiniabactin in *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *Int. J. Med. Microbiol.* **296**: 513-520.
- Valvano, M.A., Silver, R.P. & Crosa, J.H. (1986)** Occurrence of chromosome- or plasmid-mediated aerobactin iron transport systems and hemolysin production among clonal groups of human invasive strains of *Escherichia coli* K1. *Infect. Immun.* **52**: 192-199.
- van Elsas, J.D. (1992)** Antibiotic resistance gene transfer in the environment: an overview. Oxford: Pergamon Press.
- van Elsas, J.D. & Bailey, J. (2002)** The ecology of transfer of mobile genetic elements. *FEMS Microbiol. Ecology.* **42**: 187-197.
- Vignais, P.M., Billoud, B. & Meyer, J. (2001)** Classification and phylogenie of hydrogenases. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**: 455-501.
- Vizan, J.L., Hernandez-Chico, C., del Castillo, I. & Moreno, F. (1991)** The peptide antibiotic microcin B17 induces double-strand cleavage of DNA mediated by *E. coli* DNA gyrase. *Embo J.* **10**: 467-476.

- Walker, J.C. & Verma, N.K. (2002)** Identification of a putative pathogenicity island in *Shigella flexneri* using subtractive hybridisation of the *S. flexneri* and *Escherichia coli* genomes. *FEMS Microbiol. Lett.* **213**: 257-264.
- Warner, P.J., Williams, P.H., Bindereif, A. & Neilands, J.B. (1981)** ColV plasmid-specific aerobactin synthesis by invasive strains of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **33**: 540-545.
- Waters, V.L. & Crosa, J.H. (1986)** DNA environment of the aerobactin iron uptake system genes in prototypic ColV plasmids. *J. Bacteriol.* **167**: 647-654.
- Waters, V.L. & Crosa, J.H. (1988)** Divergence of the aerobactin iron uptake systems encoded by plasmids pColV-K30 in *Escherichia coli* K-12 and pSMN1 in *Aerobacter aerogenes* 62-1. *J. Bacteriol.* **170**: 5153-5160.
- Waters, V.L. & Crosa, J.H. (1991)** Colicin V virulence plasmids. *Microbiol. Rev.* **55**: 437-450.
- Welch, R.A., Burland, V., Plunkett, G., 3rd, Redford, P., Roesch, P., Rasko, D., et al (2002)** Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **99**: 17020-17024.
- Whittam, T.S., Wolfe, M.L. & Wilson, R.A. (1989)** Genetic relationships among *Escherichia coli* isolates causing urinary tract infections in humans and animals. *Epidemiol. Infect.* **102**: 37-46.
- Williams, P.H. (1979)** Novel iron uptake system specified by ColV plasmids: an important component in the virulence of invasive strains of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **26**: 925-932.
- Williams, P.H., Sedgwick, M.I., Evans, N., Turner, P.J., George, R.H. & McNeish, A.S. (1978)** Adherence of an enteropathogenic strain of *Escherichia coli* to human intestinal mucosa is mediated by a colicinogenic conjugative plasmid. *Infect. Immun.* **22**: 393-402.
- Wooley, R.E., Spears, K.R., Brown, J., Nolan, L.K. & Fletcher, O.J. (1992a)** Characteristics of conjugative R-plasmids from a pathogenic avian *Escherichia coli*. *Avian Dis.* **36**: 679-684.
- Wooley, R.E., Spears, K.R., Brown, J., Nolan, L.K. & Fletcher, O.J. (1992b)** Relationship of complement resistance and selected virulence factors in pathogenic avian *Escherichia coli*. *Avian Dis.* **36**: 679-684.
- Wooley, R.E., Brown, J., Gibbs, P.S., Nolan, L.K. & Turner, K.R. (1994)** Effect of normal intestinal flora of chickens on colonization by virulent colicin V-producing, avirulent, and mutant colicin V-producing avian *Escherichia coli*. *Avian Dis.* **38**: 141-145.
- [www.sciencedaily.com/releases/2007/06/070619165543.htm](http://www.sciencedaily.com/releases/2007/06/070619165543.htm) (2007). In *Science Dailey*: The Sahlgrenska Academy, University of Göteborg.
- Xie, Y., Kim, K.J. & Kim, K.S. (2004)** Current concepts on *Escherichia coli* K1 translocation of the blood-brain barrier. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **42**: 271-279.
- Zgur-Bertok, D., Modric, E. & Grabnar, M. (1990)** Aerobactin uptake system, ColV production, and drug resistance encoded by a plasmid from an urinary tract infection *Escherichia coli* strain of human origin. *Can. J. Microbiol.* **36**: 297-299.
- Zienkiewicz, M., Kern-Zdanowicz, I., Golebiewski, M., Zylinska, J., Mieczkowski, P., Gniadkowski, M., et al (2007)** Mosaic structure of p1658/97, a 125-kilobase plasmid harboring an active amplicon with the extended-spectrum beta-lactamase gene *blaSHV-5*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **51**: 1164-1171.

## 7 Anhang

Tab. 12 Bestimmung der Kolonie bildenden Einheiten pro ml (KbE/ml) verschiedener *E. coli*-Stämme zu bestimmten Zeitpunkten des Wachstums in LB-Medium

	Stämme					
	IMT5155		DH5		IMTpD01	
Zeit (h)	OD <sub>600</sub>	KbE/ml	OD <sub>600</sub>	KbE/ml	OD <sub>600</sub>	KbE/ml
1,5	0,561	$2,4 \times 10^7$	0,149	$6,2 \times 10^6$	0,101	$6,2 \times 10^6$
3,0	2,09	$1,9 \times 10^9$	0,906	$2,0 \times 10^8$	0,712	$1,7 \times 10^8$
4,5	3,16	$2,1 \times 10^9$	1,91	$5,0 \times 10^8$	1,75	$3,6 \times 10^8$
6,0	4,70	$2,8 \times 10^9$	3,23	$1,4 \times 10^9$	3,28	$1,3 \times 10^9$
7,5	4,74	$3,5 \times 10^9$	4,33	$2,0 \times 10^9$	4,66	$2,3 \times 10^9$

Tab. 13 Bestimmung der Kolonie bildenden Einheiten pro ml (KbE/ml) verschiedener *E. coli*-Stämme zu bestimmten Zeitpunkten des Wachstums in Serum

	Stämme					
	IMT5155		DH5		IMTpD01	
Zeit (h)	OD <sub>600</sub>	KbE/ml	OD <sub>600</sub>	KbE/ml	OD <sub>600</sub>	KbE/ml
1,5	0,338	$3,9 \times 10^7$	0,121	$4,6 \times 10^6$	0,126	$5,5 \times 10^6$
3,0	0,999	$4,6 \times 10^8$	0,120	$5,7 \times 10^6$	0,197	$6,0 \times 10^6$
4,5	2,14	$2,0 \times 10^9$	0,073	$3,0 \times 10^5$	0,159	$7,4 \times 10^6$
6,0	2,84	$3,1 \times 10^9$	0,060	$5,5 \times 10^3$	0,181	$9,4 \times 10^6$
7,5	3,08	$3,2 \times 10^8$	0,062	$1,0 \times 10^3$	0,225	$4,2 \times 10^7$

Tab. 14 Anhand der offenen Leserahmen (*orf*) von p1ColV<sub>5155</sub> ermittelten Ähnlichkeiten zu DNS-Sequenzen bereits bekannter Proteine

Codierende Region ( <i>orf</i> )	Start/Ende des <i>orf</i>	Anzahl NS	Genbank (Acc. Nr.)	Ähnliche Proteinstruktur	AS des Proteins	NS des Proteins	Identität der NS	Übereinstimmung (%)
<i>eitB</i>	3 - 362	359	ABR77578	Eisen-ABC-Transportsystem; putative Permease (EitB)	345	1038	360/1038	34,6
<i>eitA</i>	359 - 1357	998	ABR77579	Eisen-ABC-Transportsystem; putatives Oberflächen-bindendes Protein (EitA)	333	999	998/999	98
<i>orf3</i>	1716 - 2302	588	EAN42275	Resolvase	196	588	588/588	100
<i>orf4</i>	2194 - 2485	291	—	Hypothetisches unbekanntes Protein	97	291	291/291	100
<i>inv</i>	2880 - 3888	1008	AAR07688	Putative Invertase (Inv)	336	1008	1008/1008	100
<i>orf6</i>	4124 - 4468	344	NP_707640	Konserviertes hypothetisches Protein in IS91	93	279	344/279	100
<i>orf7</i>	4357 - 4725	366	CAD87831	IS91-Transposase	122	366	366/36	100
<i>is30</i>	4844 - 5995	1151	CAC39292	IS30-Transposase	376	1128	1148/1152	99
<i>insN</i>	5952 - 6320	368	NP_414789	IS911-Transposase	135	405	368/405	90,9
<i>orf10</i>	6320 - 6839	519	CAA11506	Konserviertes hypothetisches Protein	140	423	519/519	100
<i>tsh</i>	6961 - 11095	4134	CAA11507	Temperatur-sensitives Hämagglutinin	1378	4134	4133/4134	100
<i>orf12</i>	11251 - 11702	451	AAF76758	Konserviertes hypothetisches Protein	150	451	451/451	100
<i>orf13</i>	11689 - 11946	258	—	Hypothetisches unbekanntes Protein	86	258	258/258	100
<i>orf14</i>	12093 - 12278	186	—	Hypothetisches unbekanntes Protein	100	303	186/303	61,4

Fortsetzung Tab. 14

Codierende Region ( <i>orf</i> )	Start/Ende des <i>orf</i>	Anzahl NS	Genbank (Acc. Nr.)	Ähnliche Proteinstruktur	AS des Proteins	NS des Proteins	Identität der NS	Übereinstimmung (%)
<i>orf15</i>	12318 - 13217	900	NP_933162	IS629 Transposase	510	1530	900/1530	58,8
<i>orf16</i>	13205 - 13531	327	NP_288505	Konserviertes hypothetisches Protein	108	327	327/327	100
<i>orf17</i>	13557 - 14120	564	CAA11509	Konserviertes hypothetisches Protein	419	1257	564/1257	44,9
<i>orf18</i>	14104 - 14583	480	CAA11510	Konserviertes hypothetisches Protein	115	348	467/480	100
<i>orf19</i>	14633 - 14980	348	AAG56195	Hypothetisches Protein	186	561	348/561	62
<i>orf20</i>	14977 - 15357	381	NP_755452	Unbekanntes Protein; codiert innerhalb des Prophagen ISEc8	133	399	381/399	95,5
<i>orf21</i>	15433 - 16413	981	CAA11511	Hypothetisches Protein	266	801	981/801	100
<i>orf22</i>	16183 - 16722	540	NP_875585	Konserviertes hypothetisches Protein	162	489	540/489	100
<i>orf23</i>	16681 - 17500	819	CAA11512	Hypothetisches Protein	293	879	819/879	93,2
<i>cvi</i>	17619 - 17855	237	CAA40745	Colicin V Immunitäts-Protein (Cvi)	78	237	237/237	100
<i>cvaC</i>	17833 - 18145	312	CAA40746	Colicin V Strukturen (CvaC)	103	312	312/312	100
<i>cvaB</i>	18314 - 20410	2097	CAA40744	Colicin V Transportprotein (CvaB)	704	2112	2097/2112	99,3
<i>cvaA</i>	20403 - 21642	1239	CAA40743	Colicin V Transportprotein (CvaA)	413	1239	1239/1239	100
<i>orf28</i>	22065 - 22223	158	—	Hypothetisches unbekanntes Protein	69	207	158/207	79

Fortsetzung Tab. 14

Codierende Region ( <i>orf</i> )	Start/Ende des <i>orf</i>	Anzahl NS	Genbank (Acc. Nr.)	Ähnliche Proteinstruktur	AS des Proteins	NS des Proteins	Identität der NS	Übereinstimmung (%)
<i>orf29</i>	22393 - 22941	549	—	Hypothetisches unbekanntes Protein	124	375	549/375	100
<i>ybaA</i>	22831 - 23115	284	YP_308785	Konserviertes hypothetisches Protein	115	348	284/348	81,6
<i>orf31</i>	23171 - 23344	174	YP_308784	Konserviertes hypothetisches Protein	65	196	174/196	88,8
<i>orf32</i>	23449 - 23685	236	—	Hypothetisches unbekanntes Protein	113	339	236/339	69,6
<i>orf33</i>	23703 - 24737	1034	NP_753137	Hypothetische Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate Aldolase; Trp-sensitive	358	1077	1034/1077	96
<i>orf34</i>	24658 - 24843	185	NP_753138	Konserviertes hypothetisches Protein	77	231	185/231	80,1
<i>orf35</i>	25153 - 25320	168	NP_753139	Hypothetisches Protein	43	129	168/129	100
<i>repA3</i>	25547 - 25840	293	CAA23641	Replikations-Protein (RepA3)	61	186	293/186	100
<i>repA2</i>	25857 - 26114	258	BAA97876	Replikations-Protein (RepA2)	85	258	258/258	100
<i>srnB</i>	26398 - 2662	204	BAA97874	Protein zur Abtötung Plasmid-freier Bakterien (SrnB)	68	204	204/204	100
<i>orf39</i>	27228 - 27440	212	YP_313453	Konserviertes hypothetisches Protein	87	261	212/261	81,2
<i>finO</i>	27576 - 28134	558	YP_313451	Fertilitäts-inhibierendes Protein (FinO)	186	558	558/558	100
<i>yieA</i>	28239 - 29099	861	YP_190113	Konserviertes hypothetisches Protein	286	861	861/861	100
<i>traX</i>	29158 - 29845	687	YP_190114	F-Pilin Acetylase (TraX)	248	747	687/747	92



Fortsetzung Tab. 14

Codierende Region ( <i>orf</i> )	Start/Ende des <i>orf</i>	Anzahl NS	Genbank (Acc. Nr.)	Ähnliche Proteinstruktur	AS des Proteins	NS des Proteins	Identität der NS	Übereinstimmung (%)
<i>traI</i>	29922 - 35118	5196	YP_190115	DNS-Helikase I; DNS-Transfer (TraI)	1757	5274	5196/5274	98,5
<i>traD</i>	35184 - 37410	2226	AAT85862	DNS-Transferprotein (TraD)	717	2154	2226/2154	100
<i>traT</i>	37635 - 38465	831	AAW58918	Serumresistenz vermittelndes Protein der äußeren Membran (TraT)	276	831	831/831	100
<i>traS</i>	38398 - 38914	516	NP_052977	Transportprotein der äußeren Membran (TraS)	167	504	516/504	100
<i>traG</i>	38916 - 41703	2787	AAW58917	Stabilisierung des Zellkontaktes (TraG)	940	2823	2787/2823	98,7
<i>traH</i>	41735 - 43152	1377	AAW58916	Periplasmatisches Protein (TraH)	458	1377	1377/1377	100
<i>trbJ</i>	43108 - 43504	396	AAW58915	Pili-Assemblierung und Synthese (TrbJ)	120	363	396/363	100
<i>trbB</i>	43400 - 43895	495	AAW58914	Pili-Assemblierung und Synthese (TrbB)	165	498	495/498	99,4
<i>traQ</i>	43930 - 44215	285	AAW58913	Pili-Assemblierung und Synthese (TraQ)	94	285	285/285	100
<i>trbA</i>	44333 - 44681	348	AAW58912	Pili-Assemblierung und Produktion (TrbA)	115	348	348/348	100
<i>traF</i>	44696 - 45440	744	BAA97961	Periplasmatisches Protein (TraF)	247	744	744/744	100
<i>trbE</i>	45432 - 45690	258	AAW58910	Pili-Assemblierung und Produktion (TrbE)	85	258	258/258	100
<i>traN</i>	45716 - 47525	1809	AAW58909	Stabilisierung des Zellkontaktes (TraN)	602	1809	1809/1809	100
<i>trbC</i>	47521 - 48160	639	AAC44205	Prozessierung zu P-Typ-Pilin (TrbC)	212	639	639/639	100

*orfs* des *tra*-Operons stammen von pAPEC-O2-ColIV [Acc. NC\_007675]

Fortsetzung Tab. 14

Codierende Region ( <i>orf</i> )	Start/Ende des <i>orf</i>	Anzahl NS	Genbank (Acc. Nr.)	Ähnliche Proteinstruktur	AS des Proteins	NS des Proteins	Identität der NS	Übereinstimmung (%)
<i>traU</i>	48168 - 49140	972	AAW58907	Periplasmatisches Protein (TraU)	330	993	972/993	97,9
<i>traW</i>	49136 - 49789	654	NP_862931	Periplasmatisches Protein (TraW)	210	633	654/633	100
<i>traC</i>	50169 - 52799	2631	AAW58904	Periplasmatisches Protein, DNS-Transferprotein, Primase (TraC)	876	2631	2631/2631	100
<i>orf60</i>	52925 - 53288	363	AAW58901	Konserviertes hypothetisches Protein	120	363	263/263	100
<i>orf61</i>	53315 - 53531	216	AAW58902	Konserviertes hypothetisches Protein	71	216	216/216	100
<i>orf62</i>	53610 - 54123	513	AAB61932	Konserviertes hypothetisches Protein	157	474	513/474	100
<i>traR</i>	54076 - 54255	180	AAW58900	Initiiert Transkription der Tra-Region (TraR)	70	213	180/213	84,5
<i>traV</i>	54432 - 54948	516	AAW58899	Pili-Assemblierung und Produktion (TraV)	171	516	516/516	100
<i>trbG</i>	55020 - 55197	177	BAA97951	Pili-Assemblierung und Produktion (TrbG)	83	252	177/252	21,1
<i>trbD</i>	55193 - 55511	318	NP_061459	Pili-Assemblierung und Produktion (TrbD)	105	318	318/318	100
<i>traP</i>	55507 - 56080	573	AAW58896	Inneres Membranprotein (TraP)	190	573	573/573	100
<i>traB</i>	56069 - 57497	1428	AAW58896	Pili-Assemblierung und Produktion (TraB)	475	1428	1428/1428	100
<i>traK</i>	57496 - 58105	609	AAW58894	Periplasmatisches Protein (TraK)	242	729	609/729	83,5
<i>traE</i>	58212 - 58778	567	AAW58893	Pili-Assemblierung und Produktion (TraE)	188	567	567/567	100

*orfs* des *tra*-Operons stammen von pAPEC-O2-ColV [Acc. NC\_007675]

Fortsetzung Tab. 14

Codierende Region ( <i>orf</i> )	Start/Ende des <i>orf</i>	Anzahl NS	Genbank (Acc. Nr.)	Ähnliche Proteinstruktur	AS des Proteins	NS des Proteins	Identität der NS	Übereinstimmung (%)
<i>traL</i>	58800 - 59112	312	AAW58892	Pili-Assemblierung und Produktion (TraL)	103	312	312/312	100
<i>traA</i>	59126 - 59486	360	AAW58891	Pili-Assemblierung und Produktion (TraA)	119	360	360/360	100
<i>traY</i>	59519 - 59839	321	AAW58890	DNS-Transferprotein (TraY)	106	321	321/321	100
<i>traJ</i>	59840 - 60524	684	AAW58889	Inneres Membranprotein (TraJ)	227	684	684/684	100
<i>traM</i>	60718 - 61101	384	AAW58888	DNS-Transferprotein (TraM)	127	384	384/384	100
<i>orf76</i>	61353 - 61979	626	AAN82107	Unbekanntes Protein codiert durch ISEc8	215	645	626/645	100
<i>orf77</i>	61976 - 62324	348	AAN82108	Unbekanntes Protein codiert durch ISEc8	115	348	348/348	97,1
<i>orf78</i>	62497 - 63012	515	AAN82110	Unbekanntes Protein codiert durch ISEc8	367	1104	515/1104	100
<i>iroN</i>	64128 - 66306	2178	AAS80269	Salmocheilin-Rezeptor (IroN)	725	2178	2178/2178	46,6
<i>iroE</i>	66350 - 67341	957	YP_444109	Eisenabhängige Hydrolase (IroE)	318	957	957/957	100
<i>iroD</i>	67391 - 68621	1230	AAN76100	Eisenaabhängige Enterochelin-Esterase (IroD)	409	1230	1230/1230	100
<i>iroC</i>	68724 - 72510	3786	AAN76099	Eisenaabhängige Enterochelin-Esterase (IroC)	1261	3786	3786/3786	100
<i>iroB</i>	72523 - 73687	1164	NP_753168	Putative Glukosyltransferase (IroB)	387	1164	1164/1164	100
<i>orf84</i>	73837 - 74107	270	AY205565	Konserviertes hypothetisches Protein	89	270	270/270	100

*orfs* des *tra*-Operons stammen von pAPEC-O2-ColV [Acc. NC\_007675]

Fortsetzung Tab. 14

Codierende Region ( <i>orf</i> )	Start/Ende des <i>orf</i>	Anzahl NS	Genbank (Acc. Nr.)	Ähnliche Proteinstruktur	AS des Proteins	NS des Proteins	Identität der NS	Übereinstimmung (%)
<i>orf85</i>	74359 - 74994	635	CAA54707	Konserviertes hypothetisches Protein	100	303	635/303	100
<i>orf86</i>	75104 - 75409	305	CAA54710	Konserviertes hypothetisches Protein	90	273	305/273	100
<i>orf87</i>	75734 - 76267	475	AAB40752	Konserviertes hypothetisches Protein	157	475	475/475	100
<i>iss</i>	76250 - 76591	309	AAS80261	Serumresistenz vermittelndes Protein (Iss)	102	309	309/309	100
<i>orf89</i>	76763 - 76915	152	—	Hypothetisches unbekanntes Protein	62	189	152/189	80,4
<i>tnpG</i>	77268 - 77638	368	AAZ89601	IS1-Transposase	122	368	368/368	100
<i>orf91</i>	77672 - 78496	824	AAX22093	IS2-Transposase	302	906	824/906	100
<i>orf92</i>	78837 - 80104	1267	AAP42493	Konserviertes hypothetisches Protein	397	1194	1267/1194	100
<i>orf93</i>	80114 - 80267	153	—	Hypothetisches unbekanntes Protein	50	153	153/153	100
<i>orf94</i>	80283 - 80595	312	AAP42494	Hypothetisches Protein	103	312	312/312	100
<i>orf95</i>	80783 - 82172	1389	CAD09789	Konserviertes hypothetisches Protein	465	1398	1389/1398	99,4
<i>orf96</i>	82209 - 82398	189	—	Hypothetisches unbekanntes Protein	62	189	189/189	100
<i>orf97</i>	82407 - 83345	938	YP_268363	Konserviertes hypothetisches Protein	312	938	938/938	100
<i>orf98</i>	83464 - 83784	320	—	Hypothetisches unbekanntes Protein	75	228	320/228	100
<i>insB</i>	84007 - 84510	504	AAK09058	IS1-Transposase (InsB)	167	504	504/504	100

Fortsetzung Tab. 14

Codierende Region ( <i>orf</i> )	Start/Ende des <i>orf</i>	Anzahl NS	Genbank (Acc. Nr.)	Ähnliche Proteinstruktur	AS des Proteins	NS des Proteins	Identität der NS	Übereinstimmung (%)
<i>etsC</i>	84922 - 86292	1370	YP_444081	ABC-Transporter; äußeres Membranprotein (EtsC)	456	1370	1370/1370	100
<i>etsB</i>	86296 - 86691	395	YP_444080	ABC-Transporter; ATP-bindendes Protein (EtsB)	646	1941	395/1941	20,4
<i>orf102</i>	86810 - 86986	176	YP_443998	IS/-assoziiertes, konserviertes hypothetisches Protein	70	213	176/213	82,6
<i>insB</i>	86997 - 87501	504	AAK09058	IS/-Transposase (InsB)	167	504	504/504	100
<i>etsB</i>	87435 - 88943	1508	YP_444080	ABC-Transporter; ATP-bindendes Protein (EtsB)	646	1941	1508/1941	77,7
<i>etsA</i>	89009 - 90217	1208	YP_444079	ABC-Transporter; Efflux Pumpenprotein (EtsA)	125	378	1208/378	100
<i>orf106</i>	91080-91371	291	—	Hypothetisches unbekanntes Protein	96	291	291/291	100
<i>insN</i>	91328 - 91501	174	NP_414789	IS911 Transposase	280	840	174/840	20,7
<i>orf108</i>	91709 - 91891	182	NP_754365	Transposase	159	480	182/480	37,9
<i>orf109</i>	92083 - 92304	221	—	Hypothetisches unbekanntes Protein	87	264	221/264	83,7
<i>orf110</i>	92663 - 93069	398	—	Hypothetisches unbekanntes Protein	129	390	390/390	100
<i>ompT</i>	93158 - 94112	954	YP_444072	Äußeres Membranprotein T (OmpT)	317	954	954/954	100
<i>orf112</i>	94207 - 94452	245	—	Hypothetisches unbekanntes Protein	94	285	245/285	86
<i>hlyF</i>	94544 - 95654	1110	AAO49613	Aviäres Hämolyysin F (HlyF)	369	1110	1110/1110	100
<i>orf114</i>	95728 - 96624	896	CAD05890	Konserviertes hypothetisches Protein; putativer Transkriptionsaktivator Mig-14	298	896	896/896	100

Fortsetzung Tab. 14

Codierende Region ( <i>orf</i> )	Start/Ende des <i>orf</i>	Anzahl NS	Genbank (Acc. Nr.)	Ähnliche Proteinstruktur	AS des Proteins	NS des Proteins	Identität der NS	Übereinstimmung (%)
<i>orf115</i>	97310 - 97606	296	YP_444070	Konserviertes hypothetisches Protein	246	740	296/740	40
<i>orf116</i>	97647 - 98004	357	YP_444067	Putative Transposase	118	357	357/357	100
<i>orf117</i>	98261 - 98651	390	AY333434	Hypothetisches Protein	129	390	390/390	100
<i>orf118</i>	98864 - 99155	291	YP_443996	ISI-assoziiertes konserviertes hypothetisches Protein	96	291	291/291	100
<i>sitA</i>	99883 - 100798	915	AY126440	Periplasmatisches Bindeprotein (SitA)	304	915	915/915	100
<i>sitB</i>	100797 - 101624	828	CP000266	Eisentransportprotein; ATP-bindende Komponente (SitB)	275	828	828/828	100
<i>sitC</i>	101621 - 102479	858	AE005674	Eisentransportprotein; Komponente der inneren Membran (SitC)	285	858	858/858	100
<i>sitD</i>	102475 - 103333	858	CP000036	Eisentransportprotein; Komponente der inneren Membran (SitD)	285	858	858/858	100
<i>eno</i>	103883 - 104146	435	NP_863027	Putative Enolase (Eno)	109	330	435/330	100
<i>orf124</i>	103984 - 104418	264	CAH64819	Hypothetisches Protein	144	435	264/435	60,7
<i>orf125</i>	104415 - 104687	273	AE016872	Hypothetisches Protein	427	1284	273/1284	21,3
<i>crcB</i>	10475 - 105140	381	AJ851089	Protein verhindert DNS-Aufspaltung (CrcB)	126	381	381/381	100
<i>shiF</i>	105600 - 106539	939	YP_444056	Putatives Membrantransportprotein (ShiF)	287	864	939/864	100
<i>shiG</i>	106361 - 106790	429	YP_444057	Konserviert hypothetisches Protein (ShiG)	142	429	429/429	100
<i>iucA</i>	106788 - 108570	1782	YP_444058	Aerobaktin Synthetase (IucA)	593	1782	1782/1782	100

Fortsetzung Tab. 14

Codierende Region ( <i>orf</i> )	Start/Ende des <i>orf</i>	Anzahl NS	Genbank (Acc. Nr.)	Ähnliche Proteinstruktur	AS des Proteins	NS des Proteins	Identität der NS	Übereinstimmung (%)
<i>iucB</i>	108576 - 109524	948	YP_444059	N-Hydroxylysine-Acetylase; Aerobaktin Biosyntheseprotein (IucB)	315	948	948/948	100
<i>iucC</i>	109523 - 111266	1743	YP_444060	Aerobaktin Biosyntheseprotein (IucC)	580	1743	1740/1740	100
<i>iucD</i>	111263 - 112541	1278	YP_444061	L-Lysin-6-Monooxygenase (IucD)	425	1278	1278/1278	100
<i>iutA</i>	112622 - 114824	2202	YP_444062	Aerobaktin Rezeptor-Protein (IutA)	733	2202	2202/2202	100
<i>orf134</i>	114949 - 115171	222	—	Hypothetisches unbekanntes Protein	73	222	222/222	100
<i>insA</i>	115324 - 115600	276	AF550679	InsAcp3	91	276	276/276	100
<i>orf136</i>	115919 - 116942	1023	YP_194858	Hypothetisches Protein (Orf53c)	340	1023	1023/1023	100
<i>orf137</i>	116927 - 118490	1563	YP_194859	Hypothetisches Protein (Orf54c)	521	1566	1566/1566	100
<i>vagD</i>	118755 - 119477	723	YP_194860	Plasmid Stabilität/Teilung (VagD)	138	417	723/417	100
<i>mck</i>	118803 - 119204	402	NP_863394	Hypothetisches Protein (VagD)	138	672	402/672	59,8
<i>kor</i>	119216 - 119560	345	NP_863395	Hypothetisches Protein (VagC)	76	231	345/231	100
<i>orf141</i>	119699 - 123554	3855	AAR05716	Hypothetisches Protein (Orf57)	1274	3825	3855/3825	100
<i>vagD</i>	123551 - 124315	765	YP_194860	Plasmid Stabilität/Teilung (VagD)	138	414	765/414	100
<i>mck</i>	123599 - 124000	402	NP_863394	Hypothetisches Protein (VagD)	224	672	402/672	59,8

Fortsetzung Tab. 14

Codierende Region ( <i>orf</i> )	Start/Ende des <i>orf</i>	Anzahl NS	Genbank (Acc. Nr.)	Ähnliche Proteinstruktur	AS des Proteins	NS des Proteins	Identität der NS	Übereinstimmung (%)
<i>kor</i>	124012 - 124242	231	NP_863395	Hypothetisches Protein (VagC)	76	231	231/231	100
<i>orf145</i>	124507 - 124992	486	AAR05719	Hypothetisches Protein (Orf60)	166	501	486/501	97
<i>orf146</i>	125021 - 125794	774	AAR05720	Hypothetisches Protein (Orf61)	228	687	774/687	100
<i>orf147</i>	125961 - 127095	480	AAR05721	Hypothetisches Protein (Orf62)	377	1134	480/1134	42,3
<i>orf148</i>	125961 - 127371	1410	AAR05722	Hypothetisches Protein (Orf63c)	162	489	1410/489	100
<i>orf149</i>	127429 - 128106	677	AAN82107	Unbekanntes Protein kodiert durch ISEc8	215	648	677/648	100
<i>orf150</i>	128187 - 128381	194	—	Hypothetisches unbekanntes Protein	59	180	194/180	100
<i>orf151</i>	128103 - 128451	348	AAN82108	Unbekanntes Protein kodiert durch ISEc8	115	348	348/348	100
<i>orf152</i>	128473 - 130045	1572	AAW51736	Putative Transposase (Aec53)	523	1572	1572/1572	100
<i>ccdA</i>	130902 - 131121	219	NP_061421	Protein zur Abtötung Plasmid-freier Zellen nach der Teilung (CcdB)	72	219	219/219	100
<i>ccdB</i>	131107 - 131439	332	NP_061422	Protein zur Abtötung Plasmid-freier Zellen nach der Teilung (CcdA)	101	306	332/306	100
<i>resD</i>	131639 - 132247	609	NP_061423	Resolvase D (ResD)	229	690	609/690	88,3
<i>repB</i>	132927 - 133685	759	CAA77820	Replikations-Protein (RepB)	243	732	759/732	100
<i>parA</i>	135579 - 136826	1247	YP_094008	Replikations-Protein (ParA)	424	1275	1247/1275	97,8



Fortsetzung Tab. 14

Codierende Region ( <i>orf</i> )	Start/Ende des <i>orf</i>	Anzahl NS	Genbank (Acc. Nr.)	Ähnliche Proteinstruktur	AS des Proteins	NS des Proteins	Identität der NS	Übereinstimmung (%)
<i>parB</i>	136823 - 137795	972	AAS58743	ParB (Putatives Protein für die Plasmidteilung)	323	972	972/972	100
<i>umuC</i>	137931 - 138716	785	AAL23540	UmuC (SOS-Antwort; Teil des Prozessivitätsfaktors)	202	609	785/609	100
<i>samB</i>	138729 - 139064	336	NP_490544	SamB (entsteht infolge mutationsauslösender UV-Strahlung)	424	1275	336/1275	26,4
<i>orf162</i>	139085 - 140138	1053	AAO59031	Phagen-Integrase	336	1011	1053/1011	100
<i>orf163</i>	140161 - 142346	2185	AAK49538	Rekombinase	628	1887	2185/1887	100
<i>insB</i>	142403 - 142907	504	AAO49620	IS <i>I</i> -Protein (InsB)	167	504	504/504	100
<i>orf165</i>	142437 - 142728	291	YP_443996	IS <i>I</i> -assoziiertes konserviert hypothetisches Protein	96	291	291/291	100
<i>orf166</i>	143186 - 143602	416	—	Hypothetisches unbekanntes Protein	92	279	416/279	100
<i>ssb</i>	143752 - 144546	794	YP_308750	Einzelstrang-bindendes DNS Protein (Ssb)	177	534	749/534	100
<i>ycjA</i>	144515 - 145060	546	—	Hypothetisches unbekanntes Protein	682	2049	546/2049	26,6
<i>orf169</i>	145091 - 146566	1475	YP_308757	Konserviertes hypothetisches Protein	652	1959	1475/1959	75,3
<i>psiB</i>	146617 - 147055	438	AAW58881	SOS-Antwort inhibierendes Protein B (PsiB)	145	438	438/438	100
<i>psiA</i>	147052 - 147772	720	AAW58880	SOS-Antwort inhibierendes Protein A (PsiA)	239	720	720/720	100
<i>sok</i>	147782 - 147943	161	CAA29258	Gegenstrang RNS (SOK; bindet an Mok)	70	213	161/213	75,6

Fortsetzung Tab. 14

Codierende Region ( <i>orf</i> )	Start/Ende des <i>orf</i>	Anzahl NS	Genbank (Acc. Nr.)	Ähnliche Proteinstruktur	AS des Proteins	NS des Proteins	Identität der NS	Übereinstimmung (%)
<i>ygdA</i>	148445 - 148813	368	AAO49636	Hypothetisches Protein	114	345	368/345	100
<i>orf174</i>	148921 - 149119	198	NP_862913	Hypothetisches Protein	95	288	198/288	68,8
<i>orf175</i>	149141 - 150058	919	NP_061448	Konserviertes hypothetisches Protein	240	723	919/723	100

Tab. 15 Anhand der offenen Leserahmen (*orf*) von p2<sub>5155</sub> ermittelten Ähnlichkeiten zu DNS-Sequenzen bereits bekannter Proteine

Codierende Region ( <i>orf</i> )	Start/Ende des <i>orf</i>	Anzahl NS	Genbank (Acc. Nr.)	Ähnliche Proteinstruktur	AS des Proteins	NS des Proteins	Identität der NS	Übereinstimmung (%)
<i>bla</i>	41 - 554	513	CAB37325	β-Laktamase	286	861	158/160	98,8
<i>lacZ</i>	910 - 1399	489	AAN78938	β-Galaktosidase	1024	3072	151/160	94,4
<i>murL</i>	1416 - 1493	57	ADC29198	Glutamat-Racemase	549	1647	19/118	100
<i>yafZ</i>	1511 - 2357	846	CAE55803	Hypothetisches Protein YafZ	272	816	272/272	100
<i>yfiX</i>	2358 - 2898	540	CAE55804	Hypothetisches Protein aus der Fam. der Antirestriktionsproteine	161	483	161/161	100
<i>yeeS</i>	2899 - 3274	375	CAI43901	DNS-Reparaturenzym RadC	64	163	64/64	100
<i>hlyA</i>	3375 - 3545	170	ACE60650	Hämolysin A (HlyA)	105	306	42/42	100
<i>orf8</i>	3496 - 3922	426	NP_040360	13,8 kDa Orf	123	369	117/122	95,9
<i>orf9</i>	3930 - 4104	174	NP_040359	10,2 kDa Orf	96	288	61/66	92,6
<i>orf10</i>	3825 - 4104	279	J01749	Hypothetisches Protein, 9,4 kDa Orf	84	252	83/84	100

## Zusammenfassung

Aviäre pathogene *E. coli* (APEC) gehören zusammen mit den uropathogenen (UPEC), Neugeborenen-Meningitis (NMEC) hervorrufenden und den septikämischen *E. coli* zu den extra-intestinal pathogenen *E. coli* (ExPEC). In der Literatur über ExPEC wird häufig angenommen, dass die Virulenz des APEC-Pathotyps spezifisch an die Präsenz Colicin V-codierender Plasmide gekoppelt ist. Den Ergebnissen dieser Arbeit zur Folge lassen sich ColV-Plasmide allerdings auch mit hoher Prävalenz bei humanpathogenen NMEC-Stämmen nachweisen, was gegen eine Pathotypspezifität spricht. In dieser Arbeit wurde die Bedeutung des ~ 180 kb großen ColV-codierenden Plasmids p1ColV<sub>5155</sub> für den APEC-Stamm IMT5155 (O2:K1:H5) untersucht. Dieser Stamm besitzt noch ein weiteres, niedermolekulares ~ 4,6 kb großes Plasmid (p2<sub>5155</sub>) mit Ähnlichkeit zur Familie der ColE1-Plasmide. Während p2<sub>5155</sub> vollständig sequenzanalysiert werden konnte, liegen von p1ColV<sub>5155</sub> zurzeit rund 151 kb sequenziert und charakterisiert vor. Die Analyse der DNS-Sequenz des ColV-Plasmids ergab verschiedene genetische Inseln mit Informationen für eine gesteigerte Serumresistenz („*increased serum survival protein*“, *Iss*), Adhäsion (Temperatursensitives Hämagglutinin, *Tsh*), sowie für fünf Operons verschiedener ABC-Transportsysteme (EitABC, EtsABCD, Salmochelin, SitABCD und Aerobaktin), von denen die letzten drei für die Aufnahme von Eisenionen eine Rolle spielen. Spezielle Versuchsbedingungen bestätigten eine hohe Affinität der p1ColV<sub>5155</sub>-codierten Siderophore Aerobaktin und des ABC-Transporters Sit für Eisenionen. Inwiefern Eisenionen auch für die Regulation virulenzassoziierter Gene des ColV-Plasmids von Bedeutung sind, wurde in  $\beta$ -Galaktosidase-Expressionsstudien mit den Promotoren von *iss* und *tsh* untersucht. Die ermittelten Ergebnisse implizieren, dass die Aktivitäten beider Promotoren infolge einer guten Nähr-/Kohlenstoffversorgung und einer Temperatur von mindestens 37°C beeinflusst werden. Dabei steigt die Promotoraktivität von *iss* auf über 21.000 Units/ml an, während der *tsh*-Promotor mit einer Aktivität von 3.669 Units/ml vergleichsweise sehr viel schwächer und spezifischer reguliert zu sein scheint. Die Aktivität des *iss*-Promotors wird zudem durch Komponenten des Serums herauf und durch einen Mangel an Eisenionen herunter reguliert. Welche zusätzlichen Effektoren regulatorischen Einfluss auf die Expression von *tsh* nehmen, konnte nicht ermittelt werden. *In vivo* Versuche mit einer p1ColV<sub>5155</sub>-*E. coli* K12-Transformante (IMTp1D01) hatten keine Morbidität der Tiere, aber eine im Vergleich zur Negativ-Kontrolle (DH5) leicht höhere Wiederfindungsrate der Transformante aus Lunge und Niere zur Folge. Verschiedene *in vitro* Versuche ergaben keine Konjugationsfähigkeit, aber eine hohe Stabilität des p1ColV<sub>5155</sub>-Plasmids in *E. coli* K12. Zudem wies IMTp1D01 eine erhöhte Tenazität in Makrophagenzellen (J774) und eine signifikant höhere Resistenz bei Wachstums-Assays in Hühnerserum auf. Die Vielzahl ColV-codierter Siderophoren sowie die plasmidassoziierte Expression und Sekretion des Mikrozens Colicin V, erhöhen gleichermaßen die Fitness apathogener wie pathogener aviärer *E. coli* in der Umwelt und im Intestinaltrakt von Hühnern. Neben den Siderophoren sind die Serumresistenz und die Überlebensfähigkeit in Makrophagen eine wesentliche Voraussetzung für das Vorkommen von APEC im Blutkreislauf von Geflügel. Damit ermöglicht das ColV-Plasmid zusammen mit virulenzassozierten, chromosomal codierten Faktoren die Infektion prädisponierter Tiere. Die Infektion geschwächter Tiere ist sehr wahrscheinlich ein evolutionärer Entwicklungsschritt, bei dem sich ein harmloses Bakterium durch die Besiedlung einer anderen ökologischen Nische in ein pathogenes Bakterium verwandelt. Die Eigenschaften des ColV-Plasmids sind für diesen Entwicklungsschritt wesentlich.

## Summary

Avian pathogenic *E. coli* (APEC) are a subgroup of the extraintestinal pathogenic *E. coli* pathotype, which include uropathogenic *E. coli* (UPEC), neonatal-meningitis *E. coli* (NMEC) and septicemic *E. coli*. Apparently large colicin V encoding plasmids are commonly associated with the virulence of APEC. But the results of this study contribute to the knowledge that the presence of the ColV-type plasmid is also linked with NMEC strains. Although large ColV-plasmids are often considered a feature of the APEC pathotype, only a few of them have been sequenced. This study investigates the involvement of the virulence associated factors coded on the ~180 kb plasmid p1ColV<sub>5155</sub> of APEC strain IMT5155 (O2:K1:H5). IMT5155 did not possess another high molecular weight plasmid but a small ~4.6 kb plasmid (p2<sub>5155</sub>), which shows similarity to the known ColE1-plasmid. About 151 bp of p1ColV<sub>5155</sub> was sequenced and analysed as well as the complete plasmid p2<sub>5155</sub>. The most prevalent virulence traits associated with the ColV-plasmids, just like p1ColV<sub>5155</sub> are serum resistance (*increased serum survival protein*, *Iss*), adhesion (*temperature-sensitive hemagglutinin*, *Tsh*) and five different ABC-transport systems (*EitABC*, *EtsABCD*, *salmochel*, *SitABCD* and *aerobactin* – the latter three being acquisition systems for iron). Studies with three cosmids, which possess only sequences of p1ColV<sub>5155</sub> *salmochel*, *sit*-operon or *aerobactin* in an iron deficient strain, confirmed the importance of *aerobactin* and the *sit*-operon for iron acquisition. Iron is an essential cofactor of many enzymes in the aerobic bacterial metabolism. The importance of iron and some other effectors in the regulation of the assumed virulence associated genes of the ColV-plasmid was tested especially for the promoter activity of *tsh* and *iss*. First the promoters of both genes were identified and ligated in a  $\beta$ -galactosidase-expression vector. Expression studies in a  $\beta$ -galactosidase mutated strain of IMT5155 corroborated the importance of environmental factors including source of sugar and a temperature up to 37°C of both promoter activities. These factors increase the activity of the *iss* promoter up to 21,000 units/ml, which indicate a strong promoter to transcribe a high concentration of proteins per cell. The lack of iron decreases and growth of the mutant in serum increased the promoter activity of *iss* as well. In contrast the activity of the *tsh* promoter was much weaker with 3,669 units/ml and there was no indication found for iron-depending factors which regulate the promoter in a special way. Results of *in vivo* assays with a p1ColV<sub>5155</sub>-transformant of *E. coli* K12 (IMTp1D01) in five week old chickens did not result in disease but in a slightly increased number of re-isolated transformants in the lungs and kidneys. However, the presence of p1ColV<sub>5155</sub> in the *E. coli* K12-strain was solid and increased the ability of the transformant to avoid destruction by bactericidal effects of macrophages (J774) and to survive in serum *in vitro*.

Many studies have shown that production of colicin V is not necessary for pathogenicity but may provide APEC a competitive advantage in asymptotically colonization of the intestinal tract, which seems to be a reservoir of ExPEC in general. Multiple iron acquisition systems adapt the strain to the environment as well. In summary the ColV-plasmids seem to increase the fitness of apathogenic avian *E. coli* and APEC because of the same ecological niche. In coherence with chromosomally coded factors for adherence and a detectable invading activity, the plasmid fitness feature of iron acquisition and a potent defending system of the host serum helps to remain in the extraintestinal tract of the host, as well. The infection of predisposed poultry seems to be a step in a process by which a harmless bacterium switches to a pathogen in another ecological niche of the host.

## Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wieler für die Bereitstellung des Themas und für die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit.

Ebenfalls danken möchte ich Frau Dr. Ewers und Herrn Dr. Tedin für die wissenschaftlichen Anregungen, Hilfestellungen und Diskussionen.

Für die freundliche Hilfe beim Erlernen der Methoden zur Aufreinigung von Megaplasmiden und der Durchführung von Zellkulturversuchen möchte ich Frau Angelika Strack und Frau Dr. Fabiana Horn danken.

Bedanken möchte ich mich auch für die Aufnahmen mit dem Konfokalen-Laserscanning-Mikroskop bei Herrn Dr. Nordhoff und für die Bereitstellung der Mutante „Iln“ bei Herrn Dr. Li.

Bei allen ehemaligen und jetzigen Mitarbeitern, Diplomanden und Doktoranden des Instituts, insbesondere Ines Diehl, Sylvia Kleta, Timo Hohmeier, Susanne Glodde und Esther Maria Antão, möchte ich mich für die freundliche Atmosphäre sowie die gute Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft bedanken.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Sylvia Kleta für ihre Bereitschaft zur kritischen Durchsicht der Dissertation und ihren vielen wertvollen Tipps.

Für die große Hilfe in allen Fragen zum Design von Grafiken und Abbildungen danke ich ganz besonders herzlich meiner Freundin Katja und Herrn Yura Heger.

Meinem Vater und allen Freundinnen, besonders Susanne, Katja, Heike, Dagmar, Ines und Sylvi danke ich für den seelischen Beistand in den dunklen Stunden der letzten Jahre und, dass sie trotz vorwiegender Einseitigkeit den Kontakt nicht aufgegeben haben.

Für seine uneingeschränkte Unterstützung und den Verzicht auf viel gemeinsame Freizeit bedanke ich mich bei Claus.